

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand-Frappier

Interactions virus-cellule lors de l'infection par le parvovirus porcine

Par
Maude Boisvert

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

Jury d'évaluation

Présidente du jury et
Examinatrice interne

Angela Pearson
INRS-Institut Armand-Frappier

Examinatrice externe

Anne Gatignol
Département de Médecine,
Microbiologie et Immunologie
McGill University

Examineur externe

Roger Lippé
Département de pathologie et biologie
cellulaire
Université de Montréal

Directeur de recherche

Peter Tijssen
INRS-Institut Armand-Frappier

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, j'aimerais exprimer mes remerciements sincères à mon directeur de recherche, Peter Tijssen. Il a cru en moi dès le départ en m'acceptant dans son laboratoire pour mes études supérieures. Il m'a permis d'effectuer un projet de recherche riche, touchant plusieurs aspects des interactions entre un virus et une cellule. Il m'a donné beaucoup de liberté dans l'élaboration et la réalisation du projet tout en étant toujours présent pour discuter des difficultés ou pour me pousser à aller toujours plus loin. Je le remercie aussi de m'avoir donné la possibilité d'assister à plusieurs conférences internationales, me permettant de découvrir des endroits très intéressants et d'échanger avec d'autres scientifiques sur les parvovirus et autres virus en général.

Je voudrais aussi remercier tous les collègues de l'institut côtoyés de près ou non pendant ces années. Je garderai de nombreux excellents souvenirs avec mes collègues de laboratoire, notamment les listes des choses à ne pas faire au laboratoire, les différentes blagues, et les discussions sérieuses ou non et toujours enrichissantes. J'ai aussi beaucoup apprécié les amitiés en dehors du laboratoire, que ce soit lors d'activités, ou lors des nombreuses heures de cours et d'études à la maîtrise! Le personnel de soutien de l'institut mérite aussi une mention importante, que ce soit pour les expériences de laboratoire (Micheline Letarte, Jessy Tremblay et Marcel Desrosiers) ou bien pour répondre à toutes mes questions sur le cheminement de la maîtrise et du doctorat (Anne Philippon).

Je remercie aussi les professeurs qui ont été impliqués de près ou de loin à mon cheminement et principalement ceux qui ont fait partie de mon comité d'encadrement au doctorat : Angela Pearson, Patrick Labonté et Véronika von Messling.

Je remercie également l'équipe du programme Apprentis en biosciences, principalement Suzanne Lemieux et Amélie Côté. Ce programme m'a permis d'apprendre tant de choses sur le mentorat, et a su raviver chaque année ma passion pour les sciences. Transmettre ses connaissances et faire découvrir notre monde aux jeunes du secondaire furent des privilèges et je garde de très bons souvenirs de chacune de ces relations de mentorat. Je suis aussi reconnaissante d'avoir pu participer à la sélection des jeunes, un processus déchirant qui nous montre que les jeunes d'aujourd'hui sont motivés et très capables de se conformer à la rigueur du processus de sélection.

Finalement, j'aimerais remercier ma famille, mes amis et mon conjoint qui ont toujours été là pour moi, tant dans les bons moments que lors des périodes plus difficiles. Ils ont été mon équilibre me permettant de décrocher de cette aventure très exigeante que sont les études supérieures. Je suis très choyée d'être aussi bien entourée, et je sais qu'ils seront là pour la suite de mon cheminement professionnel et personnel.

RÉSUMÉ

Le parvovirus porcin a été identifié et associé à des problèmes de reproduction chez les porcs dans les années 1960. L'infection d'un animal adulte est généralement asymptomatique. Les problèmes surviennent lors de l'infection d'une femelle en gestation. Ce virus est capable de passer la barrière placentaire, d'infecter et tuer les fœtus en formation. Heureusement, des vaccins ont été développés afin de prévenir les problèmes de reproduction. Cependant malgré le fait que ce virus soit connu depuis plus de 50 ans, peu d'études portant sur la biologie du virus ont été effectuées.

Le projet de thèse décrit ici avait donc comme objectif principal de mieux comprendre les interactions entre le virus et les cellules lors de l'infection *in vitro*. Pour le premier objectif, nous avons identifié plusieurs composantes cellulaires importantes lors des étapes précoces de l'infection. Nous avons montré que le virus s'attache sur les acides sialiques sur les protéines de la surface cellulaire et peut entrer dans la cellule autant par endocytose dans des vésicules de clathrine que par macropinocytose. La macropinocytose est un mode d'entrée peu spécifique et qui est montré pour la première fois pour un parvovirus. Nous avons aussi montré que les agrégats de virus, formés naturellement lors de l'infection entrent dans la cellule préférentiellement par macropinocytose, tandis que les particules virales isolées (purifiées) préfèrent l'endocytose dans les vésicules de clathrine. Dans la cellule, le virus utilise la voie endosomale, où l'acidification et le passage dans les endosomes tardifs/lysosomes ont été montrés essentiels. Pour le transport intracellulaire, autant les microtubules que l'actine ont un rôle important pour le bon déroulement de l'infection. Finalement, nous avons montré que l'activité du protéasome est essentielle pour l'infection.

Notre second objectif de recherche était d'identifier les régions des protéines structurales qui sont requises pour la reconnaissance et leur transport au noyau. Les signaux de localisation nucléaire (NLS) sont de courtes régions riches en acides aminés

basiques. Nous avons montré qu'il y a deux NLS actifs classiques dans la région unique de VP1. La protéine majoritaire de la capsid, VP2, ne contient pas de NLS classique. Nous avons donc émis l'hypothèse que le motif reconnu (NLM) dépend de la structure finale de la protéine qui sera transportée au noyau sous forme de trimère. L'analyse de la structure tridimensionnelle du trimère a permis d'identifier trois NLM potentiels. Nous avons montré que la région importante pour le transport des trimères de VP2 au noyau comprend les acides aminés K272, K275, K487, K533, R535 et R576, tous situés à proximité suite à l'assemblage en trimère. Ce motif est plus complexe que le motif en feuillet- β identifié chez le protoparvovirus MVM.

Notre troisième objectif de recherche consistait à déterminer si l'expression de la protéine non structurale NS1 était différente pour deux souches de PPV (NADL-2 et Kresse) qui ont des taux de réplication différents lors de l'infection *in vitro*. Des travaux précédents dans le laboratoire ont montré que peu importe la souche, il y a production efficace d'ADN double brin, une étape précédant l'expression de NS1. Il a cependant été montré que la cinétique d'amplification du génome viral lors de l'infection avec la souche Kresse est plus lente que lors de l'infection avec la souche NADL-2. C'est ce qui nous a motivé à vérifier l'expression de NS1. Nous avons montré que l'expression de NS1 est retardée et efficace seulement dans la moitié des cellules lors de l'infection par Kresse comparativement à NADL-2. L'expression de la protéine NS1 est donc sans contredit une étape importante de l'infection et elle diffère selon la souche virale.

Finalement, ce projet de recherche a permis d'augmenter significativement nos connaissances sur la biologie de l'infection par le parvovirus porcin. Plusieurs autres aspects de l'infection seraient maintenant intéressants à étudier tels que les mécanismes de livraison du génome au noyau ou l'export des particules nouvellement formées à la fin de l'infection.

ABSTRACT

Porcine parvovirus was identified and associated with reproductive problems in pig farms in the 1960's. Infection of the adult animal is usually asymptomatic, whereas infection during gestation can lead to infection and death of the fetus. An effective vaccine can prevent such reproductive problems in farms, but needs to be administered regularly. Despite the fact that this virus was known for over 50 years, research concerning its biology is limited.

The principal aim of this thesis was to better understand the interactions between the virus and the host cell *in vitro*. For the first objective, we identified several cellular components implicated in the early infection. We showed that the virus must first bind sialic acids on surface proteins. Then entry was possible both by clathrin endocytosis and macropinocytosis. Macropinocytosis is a nonspecific entry mode, identified for the first time for a parvovirus in this project. We also showed that aggregates, naturally arising during infection enter cells preferentially by macropinocytosis, while single, purified particles preferred clathrin endocytosis. Inside the cell, the virus needs to go through the endosomal pathway and acidification and transit to the late endosomes or lysosomes is essential. Concerning intracellular transport, both microtubules and the actin network were shown to be important for the infection. Finally, we demonstrated that proteasome activity is essential for the infection.

The second objective was to identify capsid protein sequences essential for their transport to the nucleus. Nuclear localization signals (NLS) are short stretches of basic amino acids. We showed that there are two classic NLS in the unique region of VP1 capsid protein. The major capsid protein, VP2, does not contain potential classic NLS. We hypothesized that the localization motif (NLM) was dependant on protein folding and assembly into trimers. Structural analysis of the trimer revealed three potential NLM. We showed that the active NLM for VP2 included amino acids K272, K275, K487, K533,

R535 and R576, all located in close proximity in the trimer. This NLM is more complicated than the one identified for the closely-related protoparvovirus MVM.

The third objective was to evaluate whether the expression of the non-structural protein NS1 was different for two PPV strains (NADL-2 and Kresse) that do not replicate at the same rate in cell culture. Previous work in the lab showed that infection with both strains led to a good production of double stranded DNA, a step preceding NS1 expression. However, infection with Kresse led to a delayed DNA amplification. We were then interested to look at NS1 expression after infection with these two strains. We showed that NS1 expression was delayed and effective in only half of the Kresse-infected cells compared to NADL-2 infection. NS1 expression is thus a crucial replication step, and different strains succeed differently at that step.

Finally, this research project significantly increased our knowledge concerning porcine parvovirus infection. Other steps of the infection remain to be investigated such as the mechanisms of genome delivery to the nucleus and the export of complete capsid at the end of the infection.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	iii
RÉSUMÉ.....	v
ABSTRACT	vii
TABLE DES MATIÈRES	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xiii
LISTE DES FIGURES.....	xv
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xvii
CHAPITRE 1 : Introduction	1
1 Le parvovirus porcin.....	2
1.1 Identification et épidémiologie.....	2
1.2 La famille Parvoviridae	4
1.3 Taux de mutation et nouvelles souches sur le terrain	5
1.4 Tropisme.....	8
1.5 Structure	9
1.5.1 Capside.....	10
1.5.2 Phospholipase virale.....	13
1.5.3 Génome	14
1.5.4 Protéines non structurales	15
1.5.5 Protéines de la capsid e	19
1.6 Cycle de réplication.....	20
1.6.1 Étapes précoces.....	21
1.6.2 Étapes intermédiaires	28
1.6.3 Étapes tardives	29
1.7 Interactions virus-cellule.....	32
1.7.1 Altérations du cytosquelette de la cellule	33

1.7.2	Protéasome.....	35
2	Composantes cellulaires requises pour l'infection	37
2.1	Inhibition d'une composante cellulaire à l'aide d'ARN interférent.....	38
2.1.1	Avantages de l'utilisation d'ARN interférents	40
2.1.2	Inconvénients de l'utilisation d'ARN interférents	40
2.2	Inhibition d'une composante cellulaire par la surexpression d'une protéine inactive	41
2.2.1	Avantages de la surexpression d'un dominant négatif.....	41
2.2.2	Inconvénients de la surexpression d'un dominant négatif	42
2.3	Inhibition d'une composante cellulaire à l'aide d'inhibiteurs chimiques	42
2.3.1	Avantages de l'utilisation des inhibiteurs chimiques.....	42
2.3.2	Inconvénients de l'utilisation des inhibiteurs chimiques	43
3	La localisation nucléaire des protéines	43
3.1	Signaux de localisation nucléaire	44
3.2	Motifs de localisation nucléaire	45
3.3	Mécanismes de transport à l'intérieur du noyau.....	45
3.4	Signaux et motifs de localisation nucléaire chez les parvovirus	47
4	Problématique et objectifs de recherche	50
4.1	Identification de composantes cellulaires importantes pour l'infection par le parvovirus porcin.	51
4.2	Identification des signaux de localisation nucléaire des protéines de la capsid.....	51
4.3	Détermination de l'importance de l'expression rapide de la protéine non structurale NS1	53
	CHAPITRE 2 : Premier Article	55
	Résumé de la publication.....	56
	Contribution des auteurs	57
	Abstract.....	58
	Introduction.....	58
	Material and methods	62
	Results	68

Discussion	79
Acknowledgments	83
CHAPITRE 3 : Deuxième article	85
Résumé de la publication.....	87
Contribution des auteurs	88
ABSTRACT	89
IMPORTANCE.....	89
INTRODUCTION.....	90
MATERIALS AND METHODS	93
RESULTS.....	98
DISCUSSION.....	113
ACKNOWLEDGEMENTS	117
CHAPITRE 4 : Troisième article	119
Résumé de la publication.....	120
Contribution des auteurs	121
Abstract.....	122
Introduction.....	122
Results	125
Discussion	134
Methods	137
ACKNOWLEDGEMENTS	141
CHAPITRE 5 : Discussion	143
5.1 Les composantes cellulaires essentielles aux étapes précoces.....	144
5.1.1 Attachement et entrée.....	145
5.1.2 Composantes intracellulaires.....	148
5.2 Les signaux et motifs de localisation nucléaire des protéines de la capsid du PPV.....	151
5.2.1 Signaux de localisation nucléaire de VP1up	152

5.2.2 Motifs de localisation nucléaire de VP2	155
5.2.3 Régulation temporelle des signaux de transport nucléo-cytoplasmiques	160
5.3 Importance de l'expression rapide et efficace de la protéine NS1	162
5.3.1 Expression de NS1 dans les cellules porcines	162
5.3.2 Expression de NS1 dans une lignée cellulaire bovine	163
5.3.3 Implication du taux d'expression de NS1 pour le cycle de réplication virale	164
Conclusion	167
Références.....	169
Annexe I: Résultats complémentaires.....	187
Importance des filaments intermédiaires	188
Destruction des microtubules en cours d'infection par le PPV	189
Analyse des régions basiques de VP1 et VP2.....	190
Localisation des protéines virales dans le noyau	191
Annexe II: Liste des publications	193
Articles scientifiques.....	195
Chapitre de livre.....	195

LISTE DES TABLEAUX

Première publication

Table 1 : Chemical inhibitors	70
-------------------------------------	----

Deuxième publication

Table 1 Inactivation mutations of putative NLS in VP1up	100
---	-----

Troisième publication

Table 1 : CPE caused by PPV NADL-2 or Kresse strains.....	126
---	-----

LISTE DES FIGURES

Introduction

Figure 1.1. Infection de fœtus par le parvovirus porcin.....	3
Figure 1.2. Membres de la famille <i>Parvoviridae</i>	4
Figure 1.3. Arbre phylogénique du parvovirus porcin.....	7
Figure 1.4. Structure de la capside des <i>Parvoviridae</i>	11
Figure 1.5. Trimère du parvovirus porcin.....	12
Figure 1.6. Génome du parvovirus porcin.....	15
Figure 1.7. Profil d'expression du parvovirus porcin.....	16
Figure 1.8. Cycle de réplication du PPV.....	20
Figure 1.9. Principaux mécanismes d'endocytose.....	22
Figure 1.10. Voie endosomale.....	25
Figure 1.11. Amplification du génome des parvovirus.....	29
Figure 1.12. Cytosquelette cellulaire.....	34
Figure 1.13. Génération de la sous-unité p50 du facteur NF- κ B.....	36
Figure 1.14. Mécanismes d'import nucléaire.....	46
Figure 1.15. Signal et motif de localisation nucléaire du protoparvovirus MVM.....	49
Figure 1.16. Comparaison des séquences du NLM de MVM avec les protoparvovirus CPV et PPV.....	52

Première publication

Figure 1. Kinetics of PPV infection.....	69
Figure 2. PPV binding on cell surface.....	71
Figure 3. Entry pathways.....	73
Figure 4 Cytoplasm trafficking toward the nucleus.....	76
Figure 5. Proteasome involvement.....	78

Deuxième publication

Figure 1. Basic regions (BR) identification and protein construction.....	99
Figure 2. Localization patterns of VP1-412-mCherry mutants.	101
Figure 3. Cellular localization of the VP1-412-fusion mutants.	103
Figure 4. Infectious clones with BRs mutations.....	105
Figure 5. NLM identification for VP2 protein.....	108
Figure 6. NLS and NLM mutation combinations.....	110
Figure 7. Viral amplification of NLM mutants.....	111

Troisième publication

Figure 1. Cell lines sensibility to PPV infection.	127
Figure 2. Synthesis of viral genome replication intermediate.....	128
Figure 3. NS1 production.....	129
Figure 4. Viral DNA replication kinetics.	131
Figure 5. Capsid proteins production.....	132
Figure 6. Chimeras of NADL-2 and Kresse strains.	133

Discussion

Figure 5.1. Régulation temporelle de l'exposition des signaux d'import/export des protéines de la capsid	161
---	-----

Annexe I : Résultats complémentaires

Figure 1. Inhibition de l'infection par le PPV suite à la destruction des filaments intermédiaires.	188
Figure 2. Destruction des microtubules en cours d'infection par le PPV	189
Figure 3. Identification des résidus basiques des protéines structurales du PPV.	190
Figure 4. Localisation des protéines virales en comparaison avec le nucléole.....	191

LISTE DES ABRÉVIATIONS

aa	Acide aminé
AAV	Adeno-associated virus (<i>Dependoparvovirus</i>)
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMDV	Aleutian Mink Disease Virus (<i>Amdoparvovirus</i>)
Ami	Amiloride
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	ARN interférant
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine triphosphate
B19	Parvovirus humain « B19 » (<i>Érythroparvovirus</i>)
Baf	Bafilomycin
BC	Région basique (basic cluster)
BFA	Brefeldin A
BPV	Bovine parvovirus (<i>Bocaparvovirus</i>)
BSA	Albumine de sérum bovin (Albumine bovine serum)
CLIC-GEEC	<u>C</u> lathrin- <u>I</u> ndependant <u>C</u> arriers and <u>G</u> PI- <u>E</u> nriched <u>E</u> ndocytic <u>C</u> ompartments
Chl	Chlorpromazine
CKII- α	Caseine kinase 2-alpha
CPV	Parvovirus canin (<i>Protoparvovirus</i>)
CyD	Cytochalasin D
Da (kDa)	Dalton (kilo Dalton)
dRF	Intermédiaire de réplication dimérique (dimeric replicative form)
FFU	Fluorescent foci Forming Unit
Fig	Figure
FPV	Parvovirus félin (Feline Panleukopenia Virus, <i>Protoparvovirus</i>)
g (μ g, ng)	Gramme (microgramme, nanogramme)
h	Heure
IF	Immunofluorescence
kb	Kilo-bases

l (ml, µl)	Litre (millilitre, microlitre)
Lac	Lactacystin
LatA	Latrunculin A
m (nm)	Mètre (nanomètre)
M (mM, nM)	Molaire (millimolaire, nanomolaire)
MBC	Méthyl-beta-cyclodextrin
MOI	Multiplicity of infection (nombre de virus infectieux par cellule)
mRF	Intermédiaire de réplication monomérique (monomeric replicative form)
Mt	Microtubules
MVM	Parvovirus murin (Minute Virus of Mice, <i>Protoparvovirus</i>)
Neura	Neuraminidase
Noc	Nocodazole
Ny	Nystatine
NES	Signal d'export nucléaire (Nuclear Export Signal)
NLM	Motif de localisation nucléaire (Nuclear Localization Motif)
NLS	Signal de localisation nucléaire (Nuclear Localization Signal)
NS	Protéines non structurales (NS1, NS2, NS3)
nt	Nucléotides
ORF	Cadre de lecture ouvert (open reading frame)
p4, p40	Promoteurs du PPV
p.i.	Post infection (après l'infection)
Pac	Paclitaxel
PKC	Protéine kinase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PPV	Parvovirus porcin (<i>Protoparvovirus</i>)
PstDNV	<i>Penaeus stylirostris</i> densovirus
PT	Cellules porcines (Porcine testis)
PCR (qPCR)	Réaction de polymérisation en chaine (PCR quantitatif)
RanGTP	Protéine Ran associée à la guanosine triphosphate
RanGEF	Ran – Guanine nucleotide Exchange Factor
RanGTP	Ran – GTPase activating protein
SAT	« Small alternatively translated » Protéine non structurale tardive

Sec	Seconde
ST	Cellules porcines (swine testis)
TfR	Récepteur de la transferrine
U (mU)	Unité (milli-unité)
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VP	Protéines structurales (VP1, VP2, VP3)
VP1up	Région unique de VP1 (unique part)
WASP	Protéine « Wiscott-Aldrich Syndrome »

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1 LE PARVOVIRUS PORCIN

1.1 Identification et épidémiologie

Le parvovirus porcin (PPV) a d'abord été identifié en Allemagne comme contaminant d'une culture cellulaire primaire de porcs. Plusieurs années plus tard, le PPV a été associé avec des manifestations de problèmes de reproduction dans les élevages de porcs (Dunne *et al.*, 1965, Mengeling *et al.*, 1976, Zimmerman, 2012). En effet, bien que l'infection soit quasi asymptomatique chez l'adulte, ce petit virus a la capacité de traverser la barrière placentaire et d'infecter directement les fœtus en formation. Selon les conditions, le fœtus peut être tué et résorbé, momifié ou bien, à l'opposé, survivre à l'infection (Figure 1.1). Les facteurs affectant le résultat de l'infection incluent la souche virale et le moment de la gestation lors de l'infection.

D'abord, il a été observé que certaines souches telles que NADL-2 ne passent pas la barrière placentaire, et sont donc non pathogènes pour le fœtus. La souche NADL-2 est d'ailleurs utilisée pour la production de vaccins (Paul *et al.*, 1980). Cette souche est cependant capable d'infecter et tuer les fœtus si le virus est injecté *in utero*, démontrant que la restriction se situe lors du passage de la femelle au fœtus (Mengeling *et al.*, 1984). Certaines souches comme NADL-8 réussissent à passer la barrière placentaire et peuvent infecter et tuer les fœtus seulement si l'infection a lieu avant le développement du système immunitaire du fœtus (Cutlip *et al.*, 1975). Finalement, des souches telles que Kresse sont hautement pathogènes, peuvent traverser la barrière placentaire et ont la capacité de tuer le fœtus, peu importe le moment de la gestation (Choi *et al.*, 1987).

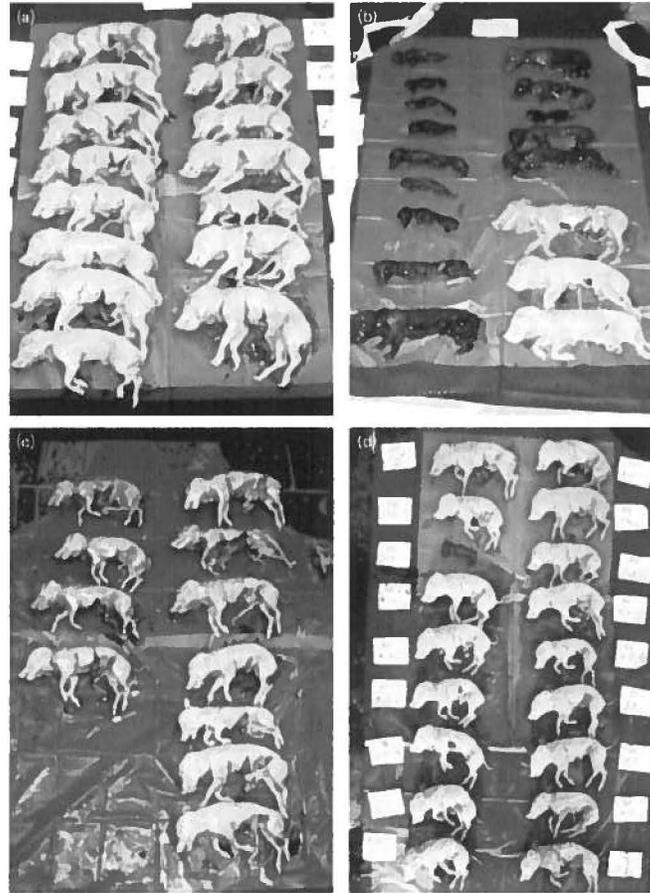


Figure 1.1. Infection de fœtus par le parvovirus porcin
 Infections expérimentales, comparant plusieurs souches de PPV. Les femelles ont été infectées au jour 40 de la gestation. Les nouvelles souches 143a (A) et 27a (B) démontrent de grandes différences au niveau de la virulence. Tous les fœtus de la femelle infectée avec la souche 143a sont normaux, et 82 % des fœtus dont la femelle a été infectée avec la souche 27a sont momifiés. C-D) Les souches de références n'ont pas affecté la survie des fœtus (PPV-IDT (C) et NADL-2 (D)). Selon la taille du fœtus momifié dans le groupe NADL-2, il était déjà décédé au moment de l'infection. Tiré de (Zeeuw *et al.*, 2007)

La gestation est un processus rapide chez les porcs et requiert environ 114 jours (Zimmerman, 2012). Il faut d'abord six jours à l'ovule fécondé pour se nicher dans le placenta (Hatching), période durant laquelle il est protégé contre l'infection. Ensuite, l'embryon se développe jusqu'au jour 35, moment du début de l'ossification du fœtus. Si l'infection par une souche pathogène a lieu avant le jour 35, le fœtus tué sera résorbé, tandis que si l'ossification a débuté, il y aura plutôt momification du fœtus mort. Le système immunitaire du fœtus sera fonctionnel à partir du jour 70, et la mort ou la survie dépendra alors de la souche virale. Le site primaire d'infection chez la femelle est habituellement les amygdales (Zimmerman, 2012). Par la suite, plusieurs cellules et

organes peuvent être infectés. La route d'infection menant au fœtus est peu connue. On sait cependant qu'il faudra environ 15 jours pour que le virus passe de la mère au fœtus.

1.2 La famille Parvoviridae

Le PPV est un membre de la famille *Parvoviridae*. Ces virus sont caractérisés par un petit génome d'ADN simple brin comportant des structures complexes en épingles à cheveux aux extrémités (Cotmore *et al.*, 2007). Ce génome, de 4-6kb, est recouvert d'une capsidie icosaédrique non enveloppée dont la taille varie entre 18 et 26 nm. Cette famille se divise en deux sous-familles : *Densovirinae*, qui regroupe les virus qui infectent les invertébrés et *Parvovirinae*, qui regroupe les virus qui infectent les vertébrés. Chaque sous-famille contient plusieurs genres selon l'organisation de leur génome et le type d'hôte infecté. Le parvovirus porcine est un membre du genre « *Protoparvovirus* » qui comprend aussi les parvovirus canins (CPV), félins (FPV) et murins (MVM) (Figure 1.2). Le parvovirus porcine a été nouvellement classé dans l'espèce « *Ungulate protoparvovirus* » lors de la modification de la classification de la famille virale (Cotmore *et al.*, 2014).

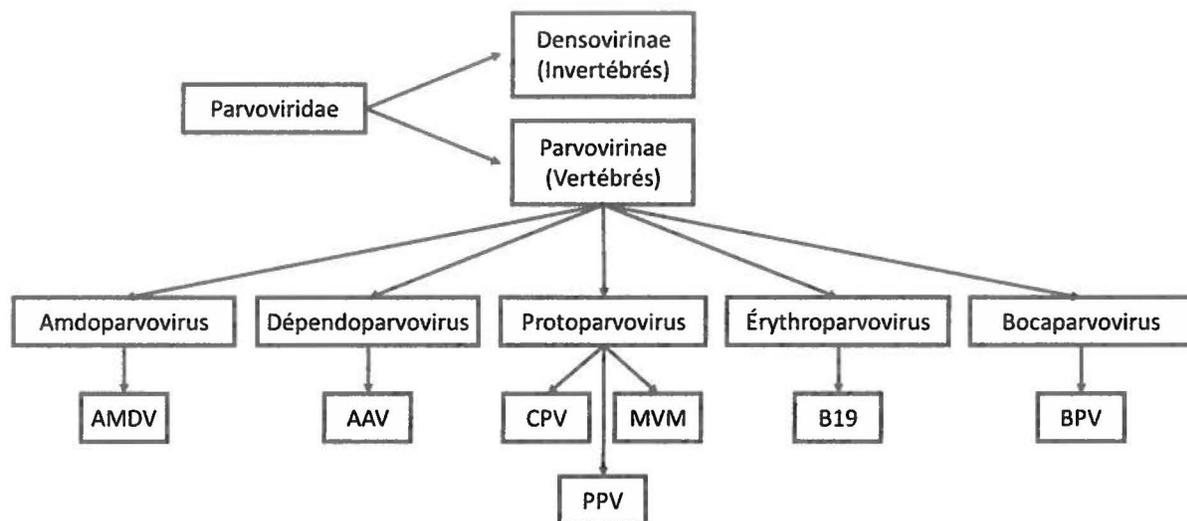


Figure 1.2. Membres de la famille *Parvoviridae*. La famille *Parvoviridae* se divise en deux sous-familles. Les *Densovirinae* infectent les invertébrés et les *Parvovirinae* infectent les vertébrés. Chaque sous-famille comprend plusieurs genres. Les genres de la sous-famille *Parvovirinae* sont indiqués avec des exemples de chacun.

Le genre « *Érythroparvovirus* » comprend le virus B19 qui infecte les humains et est responsable de la cinquième maladie chez les enfants. Ce virus est aussi dangereux pour les femmes enceintes puisqu'il y a possibilité d'infection chez le fœtus (de Jong *et al.*, 2006). Un autre genre d'intérêt est le genre « *Dépendoparvovirus* » comprenant plusieurs souches du virus « Adeno-associated virus » (AAV). Ces virus ont la particularité de dépendre d'une co-infection afin de compléter leur cycle de réplication (Geoffroy *et al.*, 2005). Le virus auxiliaire peut être un Adenovirus, un Herpesvirus, ou le virus de la vaccine. Ce genre a été identifié lors d'infection par un adénovirus, sans toutefois être associé à une pathologie plus sévère (Lux *et al.*, 2005). Étant donné que ces virus ne causent aucune maladie chez l'homme, et aussi puisqu'ils peuvent infecter une grande gamme de tissus ou organes selon la souche, ils sont d'intérêt clinique dans le développement de thérapie génique (Mueller *et al.*, 2008). Des études cliniques sont en cours pour traiter entre autres la fibrose kystique et la maladie de Parkinson. Les autres genres de la sous-famille *Parvovirinae* sont « *Amdoparvovirus* », dont le seul membre est l'AMDV (Aleutian Mink Disease Virus) infectant les mustélidés, et les « *Bocaparvovirus* » comprenant plusieurs bocavirus humains causant des infections des voies respiratoires inférieures ainsi que gastro-intestinales (Jartti *et al.*, 2012).

1.3 Taux de mutation et nouvelles souches sur le terrain

Les virus ont la capacité d'évoluer afin de s'adapter à leur environnement, ou afin d'éviter l'élimination par le système immunitaire de l'hôte (Duffy *et al.*, 2008). Lors de l'amplification du génome, certaines erreurs se glissent dans la séquence et leur fréquence dépend entre autres de la fidélité de la polymérase utilisée. Par la suite, la présence de la mutation dans un virus nouvellement produit pourra soit lui donner un avantage ou un inconvénient par rapport au virus dit « normal » qui ne porte pas cette mutation. Si la mutation est délétère, le virus mutant se répliquera moins efficacement et finira par disparaître dans la masse de virus normaux dont la réplication est plus rapide. Cependant, si la mutation donne un avantage au virus, elle pourra persister et

éventuellement être identifiée dans une nouvelle souche virale. Il faut donc distinguer deux concepts : le taux de mutations et le taux de substitutions (Duffy *et al.*, 2008). Le taux de mutations représente la quantité de mutations par nucléotide par cycle de réplication. Il dépend de la fidélité de la réplication du matériel génétique du virus. Le taux de substitutions représente la quantité de mutations qui seront sélectivement retenues dans la population virale et qui pourront être détectées dans la nature. Ce taux est exprimé en quantité de substitution par nucléotide par année. Il est généralement connu que les virus à ADN double brin, qui utilisent la machinerie cellulaire pour la réplication de leur génome ont des taux de mutations faibles (10^{-7} - 10^{-8} mutations/nucléotide/réplication), grâce à l'utilisation des mécanismes de correction cellulaires (Drake *et al.*, 2005). Les virus avec un génome d'ARN, utilisant leur propre ARN polymérase ARN-dépendante, beaucoup moins fidèle, ont des taux de mutation largement plus élevés (10^{-2} - 10^{-5} mutations/nucléotide/réplication) (Jenkins *et al.*, 2002). Les virus avec un génome d'ADN simple brin montrent des taux de mutations intermédiaires (10^{-5} - 10^{-6} mutations/nucléotide/réplication). Ceci peut être dû aux mécanismes de réplication différents des virus à ADN double brin ou à un recrutement incomplet de la machinerie de correction. Plusieurs membres de la famille *Parvoviridae* ont un taux de substitution assez élevé. Celui-ci a été estimé à environ 10^{-4} substitutions/nucléotide/an pour le PPV, CPV et B19 (Shackelton *et al.*, 2006, Shackelton *et al.*, 2005, Streck *et al.*, 2011).

L'apparition de nouvelles souches virales est donc assez fréquente chez les membres de la famille *Parvoviridae*. Plus particulièrement, chez le PPV, des études récentes ont montré non seulement que de nouvelles souches circulent présentement (Figure 1.3), mais aussi que certaines d'entre elles ne seraient pas efficacement neutralisées par les anticorps produits lors de la vaccination couramment utilisée dans les fermes (Zeeuw *et al.*, 2007). Le vaccin utilisé est souvent une souche non pathogène, telle que NADL-2, qui a été inactivée et combinée à un adjuvant. Ce type de vaccin ne procure pas de protection à long terme, et les femelles doivent être vaccinées avant chaque insémination afin de prévenir les problèmes de reproduction décrits plus haut. Ce plus, ce type vaccin n'empêche pas la réplication subséquente de certaines

souches virales présentement en circulation. Il y a donc amplification chez la femelle ainsi que relâche de virus dans l'environnement (Jozwik *et al.*, 2009). Le vaccin est tout de même efficace pour empêcher le transfert au fœtus, mais le virus peut demeurer en circulation dans la ferme. Aussi, une étude a montré que le PPV peut être détecté dans >80 % d'échantillons de porcs en santé (Streck *et al.*, 2013) appuyant le fait que le virus est en constante circulation dans les fermes malgré les programmes de vaccination.

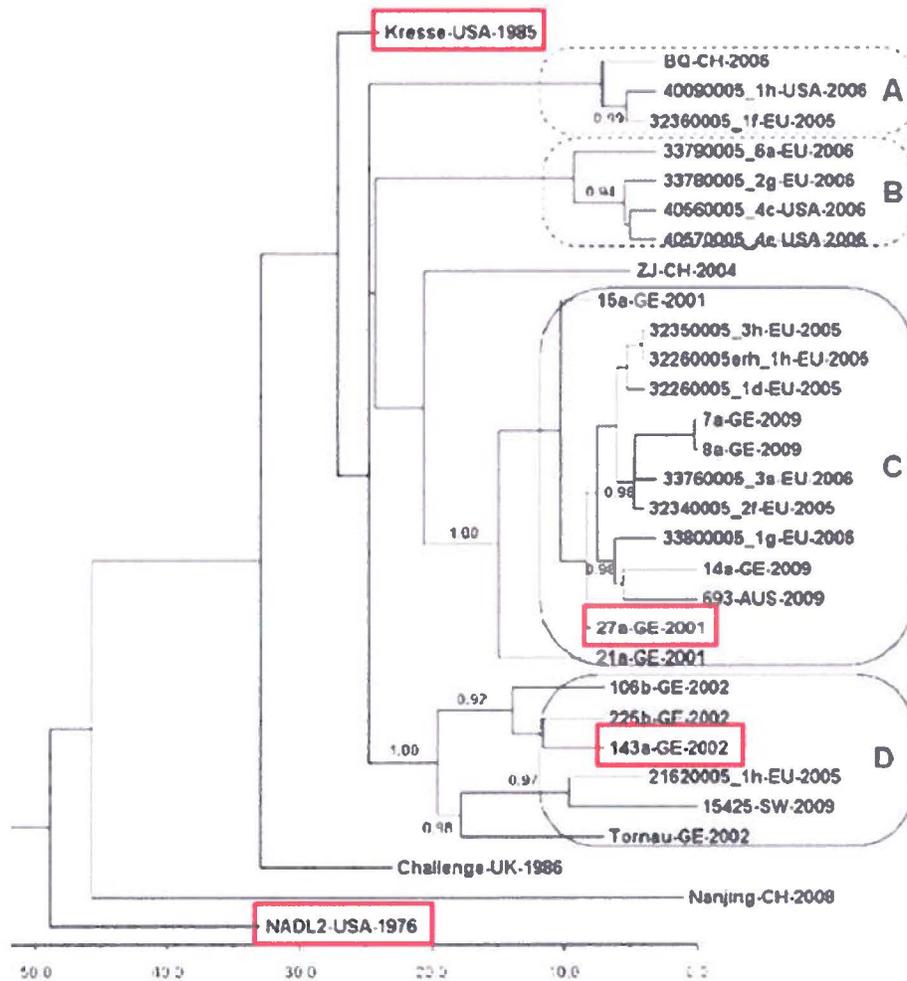


Figure 1.3. Arbre phylogénique du parvovirus porcin
Phylogénie basée sur la séquence complète de VP1. Dans cette étude, le taux de substitution du PPV a été évalué à 3×10^{-4} substitutions/nucléotide/an pour le gène VP1. On peut y observer les nouvelles souches 27a et 143a discuté dans la figure 1.1. Tiré de (Streck *et al.*, 2011)

Ces deux facteurs : le taux de substitution relativement élevé, et le fait que le virus circule continuellement dans les fermes malgré la vaccination augmentent le risque d'apparition de nouvelles souches. L'émergence d'une nouvelle souche qui serait pathogène pour le fœtus malgré la vaccination causerait des pertes économiques importantes dans le monde. De plus, il y a seulement 13 nucléotides différents, sur tout le génome, entre la souche NADL-2 (vaccinale, non pathogène) et la souche hautement pathogène Kresse, ainsi qu'une répétition de 127 nucléotides, dans la région non codante, présente chez NADL-2 et non chez Kresse (Fernandes *et al.*, 2011). Alors, les mutations nécessaires à acquérir pour créer un nouveau biotype pathogène sont relativement limitées. Il est alors primordial de suivre l'apparition des nouvelles souches de PPV et d'évaluer leur virulence. L'élaboration d'un meilleur vaccin procurant une immunité à long terme chez les femelles et donc bloquant la réplication et la circulation constante dans les fermes serait aussi souhaitable. D'un autre côté, les mécanismes permettant le transfert du PPV au fœtus ne sont pas très bien connus. Aucune réplication n'a été détectée dans les cellules du placenta, et il est connu que même les petites molécules telles que des anticorps ne passent pas de la mère au fœtus (Zimmerman, 2012). L'hypothèse est donc que le virus pourrait se rendre au fœtus via l'infection de cellules immunitaires. Le PPV phagocyté par les macrophages demeure infectieux assez longtemps sans être détruit et serait une source potentielle pour le transfert au fœtus (Paul *et al.*, 1979). Cependant, les facteurs permettant le transfert au fœtus de certaines souches comme Kresse comparativement aux souches non pathogènes demeurent inconnus. Parallèlement, peu d'informations sur la biologie du cycle de réplication du PPV étaient disponibles lors du début de ce projet de doctorat.

1.4 Tropisme

La plupart des membres de la famille *Parvoviridae* possèdent un tropisme limité. L'infection est généralement restreinte à une seule espèce et dépend non seulement de l'attachement au récepteur, mais aussi de plusieurs facteurs intracellulaires (Tijssen, 1999). Cependant, comme ces virus évoluent relativement rapidement, il est possible

d'observer l'émergence de nouveaux virus. Le meilleur exemple est sûrement l'évolution du parvovirus félin FPV vers le parvovirus canin CPV. Le FPV est en circulation chez les félins depuis plus d'un siècle (Steinel *et al.*, 2000). Ce n'est qu'en 1978 que le CPV a émergé à partir du FPV, causant une importante pandémie canine dans les années 1970-85 (Hueffer *et al.*, 2003b). Le CPV est apparu lorsque le FPV a acquis des mutations dans le gène codant pour la capsid permettant au virus de se lier au récepteur de la transferrine canin, et donc l'infection des cellules canines (Hueffer *et al.*, 2003c).

Les déterminants du tropisme pour le parvovirus porcine sont peu connus. Un variant a été identifié comme contaminant d'une lignée cellulaire canine (Vasudevacharya *et al.*, 1992). Ce contaminant a pu être détecté par immunofluorescence avec des anticorps spécifiques au PPV, et est capable de se répliquer dans les cellules porcines. Le séquençage a montré que l'acquisition de deux mutations, une située dans le gène codant pour les protéines non structurales, et une dans le gène des protéines structurales, était suffisante pour que le virus puisse se répliquer dans des cellules canines. Des travaux de notre laboratoire ont montré qu'un court fragment était déterminant pour la capacité de la souche NADL-2 de se répliquer dans des cellules primaires bovines (Bergeron *et al.*, 1996). La souche Kresse est incapable de se répliquer dans ces cellules bovines. Le fragment identifié contient 3 différences en acides aminés de la protéine VP2 entre les deux souches : D378G, H383Q, et S436P (NADL-2 → Kresse). L'échange de ce fragment entre les deux souches a permis la réplication de Kresse (contenant les acides aminés de NADL-2) et empêché la réplication de NADL-2 dans ces cellules primaires bovines. Donc, les déterminants du tropisme du PPV semblent différents selon le type cellulaire.

1.5 Structure

Les membres de la famille *Parvoviridae* possèdent une structure très compacte reconnue pour avoir une grande résistance aux conditions environnementales et à plusieurs conditions non physiologiques (Cotmore *et al.*, 2007). En effet, les virus sont

stables à de hautes températures, à des pH entre 3 et 9, à plusieurs détergents, et aux désinfectants à faible concentration. La stabilité de la structure est en partie assurée par le fait que la capsid est essentiellement composée d'une seule protéine structurale où différents prolongements en position N-terminales sont possibles (Cotmore *et al.*, 2007). Les interactions entre les protéines sont alors quasi-équivalentes et particulièrement stables.

1.5.1 Capsid

La capsid est composée de 60 copies des protéines structurales, avec une géométrie T=1 (Figure 1.4 A). Chez les membres du genre *Protoparvovirus*, la proportion des protéines minoritaires (VP1) et majoritaires (VP2) se situe entre 1:5 et 1:10. Ce rapport est contrôlé à la base par la production des ARNm. En effet, l'épissage alternatif menant à la production de l'ARNm de VP2 est plus efficace que celui menant à l'ARNm de VP1 (Tullis *et al.*, 1993). Suite à l'assemblage de la capsid, l'insertion de l'ADN provoque l'externalisation de la région N-terminale de VP2, par le pore de l'axe de symétrie 5' (Figure 1.4 A, étoile). L'ADN est aussi partiellement exposé, et attaché à la protéine NS1 (Cotmore *et al.*, 1989).

Les protéines de la capsid contiennent un cœur de huit feuillets- β antiparallèles (Figure 1.4 B, en bleu), caractéristiques de protéines structurales de virus icosaédriques (Rossmann *et al.*, 1989). Les régions entre ces feuillets- β forment des boucles, hautement variables entre les différents membres de la famille *Parvoviridae*. Ces boucles sont situées à la surface de la capsid et sont les structures en contact avec l'environnement. Ce sont les déterminants antigéniques et tropiques des différents virus. En effet, la comparaison entre les structures du Densovirus *PstDNV* et du parvovirus canin (CPV) (Figure 1.4 C) montre bien que la structure centrale constituée des feuillets- β est fortement semblable entre les deux virus, tandis que les boucles entre ces feuillets- β sont hautement différentes (Kaufmann *et al.*, 2010).

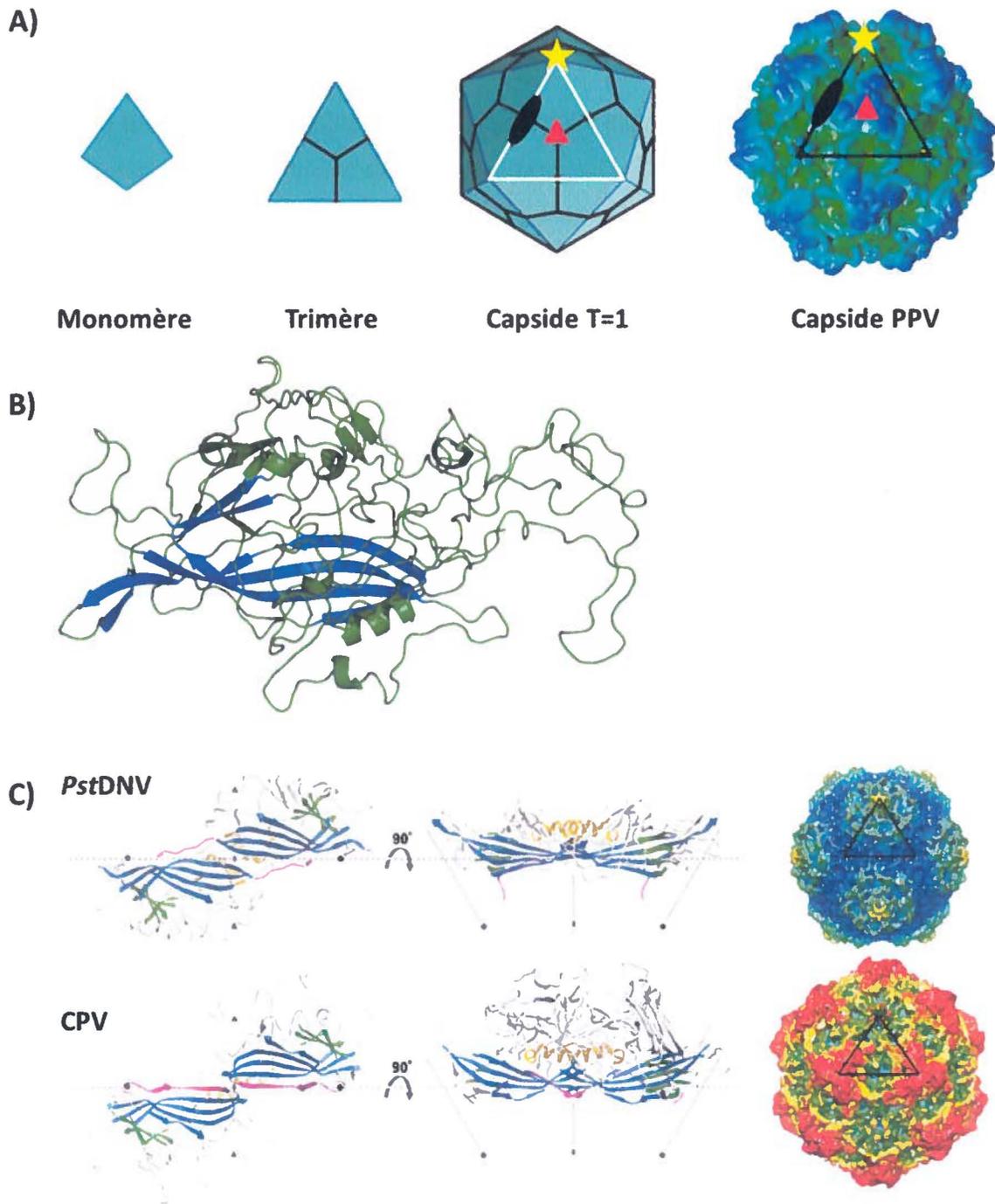


Figure 1.4. Structure de la capsidie des *Parvoviridae*

A) La structure T=1 est composée de 60 copies des protéines structurales (adapté de viralzone.expasy.org). Chez les parvovirus ces protéines s'assemblent d'abord en trimère. Le centre des trimères constitue l'axe de symétrie 3 (triangle rouge). Le côté des trimères représente l'axe de symétrie 2 (ovale noir) et la pointe des trimères représente l'axe de symétrie 5 (étoile jaune). B) Les monomères possèdent une structure compacte de 8 feuillets- β antiparallèles, conservée chez les membres de la famille. Les boucles entre les feuillets- β sont hautement variables et forment la structure de la surface de la capsidie. C) Le brevidensovirus *Pst*DNV possède une capsidie structurellement différente du protoparvovirus CPV (images de droite). Cependant, le cœur de la structure de leur protéine structurale (image de gauche, en bleu) est fortement semblable. Ainsi, ce sont les boucles entre les feuillets- β (en gris) qui déterminent la structure de la surface de la capsidie. Tiré de (Kaufmann *et al.*, 2010).

L'assemblage des protéines lors de l'infection forme d'abord des trimères (Figure 1.5 A), qui sont l'entité la plus stable (Wu *et al.*, 1993). Ceci a pu être démontré par des expériences de « crosslinking » qui ont seulement permis d'identifier des trimères (Riolobos *et al.*, 2006). Deux types de trimères ont pu être observés: un plus petit (~175 kDa), non détecté avec un anticorps spécifique à la région unique de VP1, est formé de trois protéines VP2 et un plus grand (~205 kDa), détecté par l'anti-VP1 composé, selon sa taille, de deux protéines VP2 et une protéine VP1. De plus, des mutations de résidus situés en périphérie des trimères résultent en des protéines pouvant être transportées au noyau, mais pour lesquelles l'assemblage en capside est impossible (Figure 1.5 B, Eliane Akl, travaux non publiés). Chez MVM ce type de mutation permet aussi l'assemblage en trimère, mais pas la formation de capside (Riolobos *et al.*, 2006).

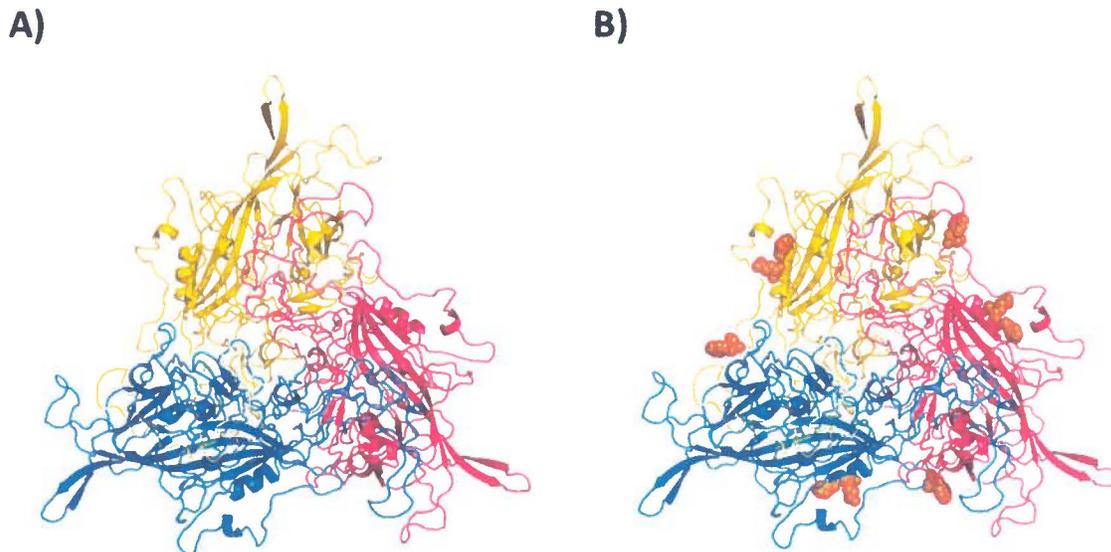


Figure 1.5. Trimère du parvovirus porcin

La production des protéines structurales mène à l'assemblage spontané en trimère (A). Ces trimères sont transportés au noyau avant l'assemblage en capside. B) Des mutations en périphéries empêchent l'assemblage en capside, malgré la localisation nucléaire (sphères oranges : P123A ; Q127A ; W540A, travaux non publiés, Eliane Akl).

1.5.2 Phospholipase virale

La protéine structurale VP1 comprend dans sa région N-terminale un motif de phospholipase A2 (PLA₂) identifiée par notre laboratoire (Canaan *et al.*, 2004, Zadori *et al.*, 2001). Ce motif est présent chez pratiquement tous les membres de la famille *Parvoviridae* et est absolument essentiel à l'infection. Ce sont les seuls virus chez lesquels une activité enzymatique de phospholipase a été retrouvée. Les phospholipases cellulaires sont des enzymes capables de cliver les phospholipides, en hydrolysant le lien ester en position 2 (sn-2), relâchant l'acide gras et une molécule de lysophospholipide (Burke *et al.*, 2009). Ces enzymes sont donc impliqués dans le métabolisme des lipides et le remodelage des membranes (Dennis, 1997).

Les virions produits avec un clone infectieux du PPV portant des mutations dans le site actif de la phospholipase (HD-41/42-AN) perdent leur capacité à se répliquer, malgré la formation de virus complet suite à la transfection (Zadori *et al.*, 2001). De plus, des expériences d'hybridation *in situ* ont montré que les virions mutants s'accumulent dans les endosomes tardifs et lysosomes, et que l'ADN n'est pas livré au noyau. Des travaux effectués avec le virus MVM ont montré que le traitement avec de la polyéthylèneimine, qui perméabilise les membranes des endosomes, permet un rétablissement de l'infection avec un virus portant une mutation au niveau de la phospholipase (Farr *et al.*, 2005). Ceci suggère fortement qu'un rôle de la PLA₂ est l'évasion de la capsid de la voie endosomale. Cependant, l'action de la PLA₂ produit des dommages limités de la membrane des endosomes, puisque l'infection en présence de dextran fluorescent a montré que seules les molécules de dextran de petite taille (3 000 Da) sont relâchées au cytoplasme lors de l'infection, alors que les molécules de dextran de grande taille (10 000 Da) demeurent emprisonnées dans la voie endosomale (Suikkanen *et al.*, 2003b).

De plus, la PLA₂ virale dépend d'une forte concentration en calcium, de l'ordre de 1mM, pour montrer une activité optimale (Canaan *et al.*, 2004). Ces hauts niveaux

de calcium seraient plutôt retrouvés dans le milieu extracellulaire, ou dans une vésicule provenant du milieu extracellulaire, comme les endosomes précoces (Gerasimenko *et al.*, 1998). Finalement, la PLA₂ virale est plus active que les phospholipases humaines du même groupe, et de tous les inhibiteurs de PLA testés, seul le manoalide a eu un effet sur la PLA₂ virale (Canaan *et al.*, 2004, Zadori *et al.*, 2001). Ceci suggère que, malgré la ressemblance avec les PLA connues, l'enzyme virale est distincte et unique. Chez les membres du genre *Protoparvovirus* la portion N-terminale de VP1 est présente à l'intérieur de la capsid chez le virion mature (Cotmore *et al.*, 2007). Celle-ci sera externalisée suite à des changements de conformation lors du passage dans la voie endosomale (Mani *et al.*, 2006). L'activité phospholipase pourra alors être utilisée comme mécanisme d'évasion de la voie endosomale permettant au virus de se rendre au cytoplasme.

1.5.3 Génome

Les membres du genre *Protoparvovirus* encapsident un génome d'ADN simple brin complémentaire (brin négatif), comportant une section codante de 4-6 kb flanquée d'extrémités non codantes avec des structures en épingles à cheveux complexes (121-421 bases (Cotmore *et al.*, 1995)). Chez le PPV ces extrémités ne sont pas identiques et la structure de l'extrémité 3' est repliée en forme de « Y » et l'extrémité 5' est repliée en forme de « T » (Figure 1.6) (Bergeron *et al.*, 1993). La région codante comporte deux cadres de lecture ouverts (gauche et droit), codant pour les protéines non structurales et structurales respectivement. Il y a un seul promoteur pour chaque cadre de lecture, p4 et p40. La capacité codante limitée des 5000 paires de bases est optimisée par l'utilisation d'épissage alternatif permettant d'augmenter le nombre de protéines exprimées. De plus, certaines souches de PPV comme NADL-2 possèdent une séquence de 127 nucléotides qui est dupliquée dans la région non codante située en aval des gènes structuraux (Bergeron *et al.*, 1996). De façon intéressante, la présence de cette répétition est généralement associée à un virus non pathogène, comme la souche NADL-2 (Martins Soares *et al.*, 2003, Simpson *et al.*, 2002,

Zimmerman, 2012). Les souches virulentes comme Kresse ne possèdent pas cette répétition.

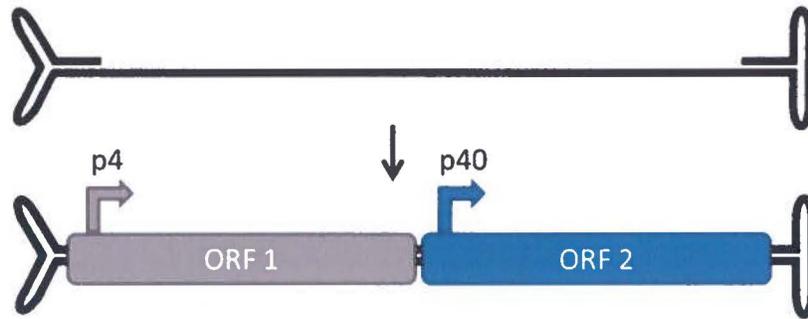


Figure 1.6. Génome du parvovirus porcin

Le génome du PPV est constitué d'ADN simple brin, aux extrémités repliées en épingles à cheveux (haut), en forme de « Y » à gauche et en forme de « T » à droite. Suite à la synthèse du 2^e brin d'ADN, le génome contient deux cadres de lecture ouverts (ORF1 et ORF2, image du bas), contenant chacun un promoteur. Le promoteur p4 permet la production des protéines non structurales et le promoteur p40 permet la synthèse des protéines structurales.

1.5.4 Protéines non structurales

Le cadre de lecture de gauche permet l'expression des protéines non structurales (NS) (Bergeron *et al.*, 1993). Un épissage alternatif permet la production de deux protéines NS1 et NS2 (Figure 1.7). L'épissage du petit intron est situé en aval du codon-stop et ne change donc pas la séquence protéique. Le transcrit permettant la production de la protéine NS1 est non épissé au niveau du grand intron.

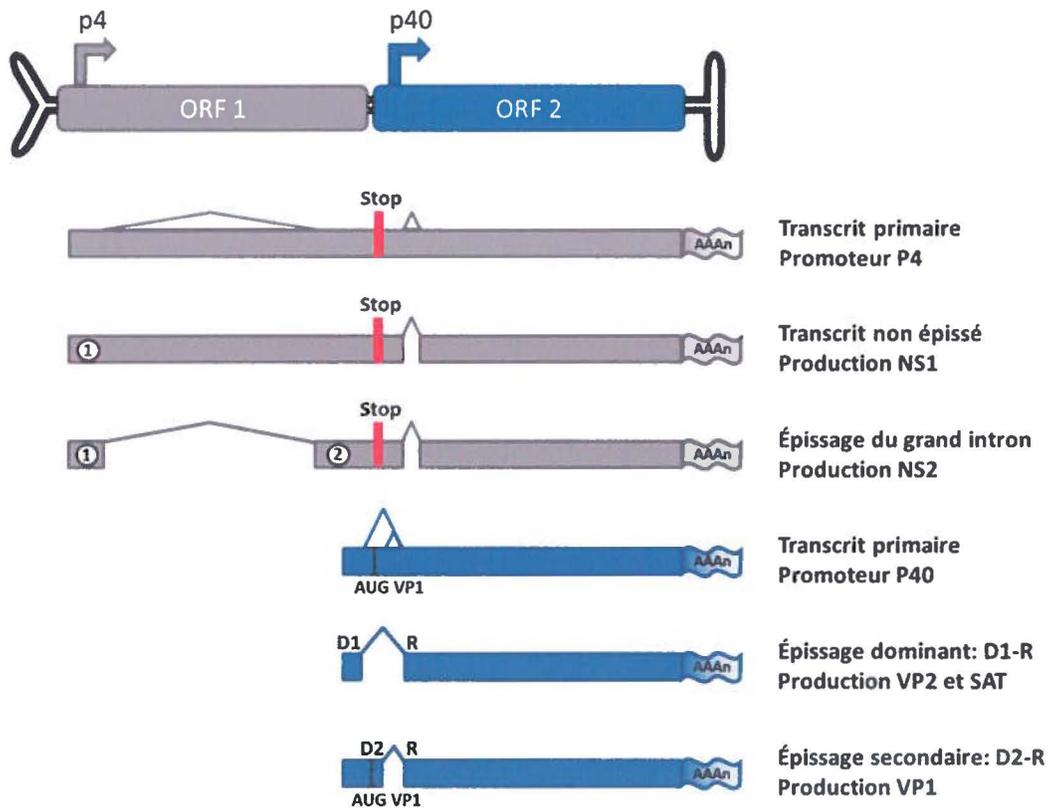


Figure 1.7. Profil d'expression du parvovirus porcin

Le génome du PPV contient deux cadres de lecture ouverts (ORF). L'ORF de gauche permet la production des protéines non structurales à partir du promoteur p4. L'unique transcrit primaire (gris, haut) contient deux sites d'épissage. Le site d'épissage du petit intron (à droite) est situé en aval du codon-stop des protéines non structurales, et ne change donc pas leur séquence. La production de la protéine NS1 se fait à partir de l'ARNm partiellement épissé (gris, centre). L'épissage complet permet la production de la protéine NS2 (gris, bas) et la séquence après l'épissage est dans un cadre de lecture différent par rapport à NS1. Il est intéressant de noter que le PPV utilise un seul signal de polyadénylation situé à la fin des régions codantes (AAAn), donnant des ARNm beaucoup plus longs que la région codante pour les transcrits des protéines NS. Les protéines structurales sont produites à partir d'un transcrit primaire unique de l'ORF de droite, à partir du promoteur p40 (bleu, haut). Chez le PPV, il y a deux sites donneurs et un site accepteur pour l'épissage. L'épissage à partir du premier site donneur (D1-R, bleu, milieu) retire le codon d'initiation de la protéine VP1, résultant en la production de la protéine VP2. L'épissage à partir du deuxième site donneur (D2-R, bleu, bas) conserve le codon d'initiation de VP1, permettant sa production. Les protéines VP1 et VP2 sont dans le même cadre de lecture, donc, VP1 contient la séquence complète de VP2 avec une région unique ajoutée en N-terminal de 150 acides aminés.

NS1 est la protéine la plus longue, et aussi une protéine essentielle à plusieurs niveaux lors de l'infection. Cette protéine multifonctionnelle possède des fonctions d'endonucléase et d'hélicase permettant de faire une cassure simple brin dans l'ADN et de dérouler les épingles à cheveux, activant l'amplification du génome (Cotmore *et al.*, 1993, Nuesch *et al.*, 1995, Rhode, 1989). NS1 induit aussi une répression de la réplication de l'ADN cellulaire, dirigeant les ressources cellulaires vers la réplication

virale (Cotmore *et al.*, 1987). NS1 est capable d'activer son propre promoteur ainsi que le promoteur p40, et donc l'expression des protéines structurales (VP) (Hanson *et al.*, 1991, Rhode, 1985b, Rhode *et al.*, 1987). NS1 est aussi impliqué dans la manifestation des effets cytopatiques à la fin de l'infection (Anouja *et al.*, 1997, Brandenburger *et al.*, 1990, Caillet-Fauquet *et al.*, 1990). NS1 est régulée par la phosphorylation de plusieurs sites (Corbau *et al.*, 2000). Certaines fonctions de NS1 dépendent de sa capacité à s'oligomériser (Nuesch *et al.*, 1993, Pujol *et al.*, 1997) et de l'ATP, comme ses fonctions hélicase, pour les coupures simple brin de l'ADN et la transactivation des promoteurs (Niskanen *et al.*, 2010). La protéine NS1 de plusieurs parvovirus a la capacité de moduler le cycle cellulaire. NS1 du parvovirus humain B19 cause un arrêt des cellules en phase G1, et active aussi l'apoptose (Moffatt *et al.*, 1998, Morita *et al.*, 2003, Yaegashi *et al.*, 1999). Chez MVM, NS1 induit l'apoptose via la perméabilisation de la membrane mitochondriale, l'action des caspases 3 et 9 et de façon indépendante de p53 (Mincberg *et al.*, 2011). La protéine NS1 du CPV induit aussi l'apoptose de manière caspases dépendante et indépendamment de p53 (Saxena *et al.*, 2013).

Chez le protoparvovirus MVM, la phosphorylation de la tyrosine 403 de NS1 par l'enzyme cellulaire PKCA est importante pour l'affinité entre NS1 et l'ADN (Nuesch *et al.*, 2001). Ceci permet non seulement l'activation de la réplication du génome, mais aussi l'activation du promoteur p38 responsable de la synthèse des protéines structurales. De plus, la phosphorylation des résidus tyrosine 435 et sérine 473 permet la régulation de la cassure simple brin essentielle pour la création de l'origine de réplication. La phosphorylation tardive de la région C-terminale de NS1 par PKC est impliqué dans les fonctions cytotoxiques de la protéine (Corbau *et al.*, 2000, Daeffler *et al.*, 2003).

En cours d'infection, NS1 est d'abord observée sous forme ponctuelle dans le noyau, au niveau des centres de réplication du génome viral (Ihalainen *et al.*, 2007). NS1 fait la navette entre le cytoplasme et le noyau et vers la fin de l'infection, NS1 est situé dans tout le nucléoplasme. NS1 interagit avec des protéines cellulaires telles que

la protéine caséine kinase II α (CKII α). Cette association est importante pour la génération des effets cytopathiques à la fin de l'infection (Nuesch *et al.*, 2006). De plus, cette association permet la phosphorylation de la capside *in vitro*. NS1 interagit aussi avec la protéine cellulaire Sp1 afin d'activer la transcription des protéines structurales (Krady *et al.*, 1995, Lorson *et al.*, 1998).

La protéine NS2 est produite suite à l'épissage du grand intron du transcrit primaire. Cette protéine est beaucoup plus petite que NS1 (environ 25 kDa) et a une courte demi-vie (Cotmore *et al.*, 1990). Les fonctions de la protéine NS2 sont l'export des virus nouvellement formés et les effets cytopathiques (Brandenburger *et al.*, 1990, Eichwald *et al.*, 2002, Miller *et al.*, 2002). Selon les parvovirus, NS2 est parfois non essentielle à la réplication *in vitro*. Le produit de l'épissage entre le premier site donneur et le dernier site receveur, produirait une courte protéine NS3 (Bergeron *et al.*, 1993). Cependant, cette protéine n'a pas été détectée lors de l'infection en culture cellulaire et ses fonctions potentielles demeurent inconnues.

Il existe aussi une protéine non structurale exprimée tardivement dans l'infection. Son gène est situé dans un cadre de lecture alternatif situé juste après le codon d'initiation de la protéine structurale VP2 (Zadori *et al.*, 2005). Ce cadre de lecture a été retrouvé chez tous les membres du genre *Protoparvovirus*, mais pas chez les autres membres de la sous-famille *Parvovirinae*, à l'exception du virus « Aleutian mink disease virus » (AMDV). Cette protéine, découverte par notre laboratoire a été nommée SAT (small alternatively translated), et ses fonctions sont peu connues. La protéine peut être traduite à partir du même ARNm que la protéine VP2 (Zadori *et al.*, 2005). L'analyse des séquences et la microscopie confocale ont montré que la protéine SAT serait une protéine membranaire localisée au réticulum endoplasmique. Des mutations dans le clone infectieux ont permis la production de virus ayant la capacité de se répliquer en culture cellulaire, mais avec une réplication et une propagation plus lente du virus. Il est possible que cette protéine soit plus importante dans un contexte *in vivo*, dans la dissémination virale par exemple.

1.5.5 Protéines de la capsid

Les protéines structurales VP1 et VP2 sont produites suite à l'épissage alternatif d'un seul ARNm primaire (Bergeron *et al.*, 1993). Lors de cet épissage, il peut y avoir le retrait du codon d'initiation de la protéine VP1, résultant en l'expression de VP2 (Figure 1.7). Si le codon d'initiation de VP1 demeure présent, il y aura expression de VP1. De plus, ces deux protéines sont dans le même cadre de lecture, produisant une protéine VP1 qui comprend la séquence entière de VP2 plus d'un prolongement N-terminale unique, nommée VP1up (« unique part »). L'épissage permettant la production de VP2 est plus efficace, et donc VP2 sera produit en plus grande quantité (Tullis *et al.*, 1993). VP2 est donc la protéine majoritaire de la capsid, 5-10 fois plus présente dans la capsid que VP1, selon le virus. Suite à leur synthèse, les protéines de la capsid s'assemblent spontanément en trimère dans le cytoplasme. Ce trimère est très stable et rapidement transporté au noyau. En effet, le trimère est beaucoup plus stable que le dimère ou le pentamère, supportant l'hypothèse que le trimère est l'unité de base de la capsid (Wu *et al.*, 1993). Ainsi, on détecte très peu de VP2 au cytoplasme lors de l'infection, par immunofluorescence. Les trimères seront formés soit de trois protéines VP2 ou deux protéines VP2 avec une protéine VP1.

L'assemblage des trimères en capsid semble dépendre d'un bon rapport entre les protéines VP2 et VP1. L'expression de VP2 seule permet la formation de capsid dans laquelle l'ADN peut être inséré, mais qui sera non infectieuse, puisque VP1up contient plusieurs fonctions essentielles (Tullis *et al.*, 1993, Zadori *et al.*, 2001). En plus de la phospholipase décrite dans la section 1.5.2, la portion N-terminale de VP1 de plusieurs parvovirus contient aussi des régions basiques correspondant à des signaux de localisation nucléaire actifs, essentiels pour l'infection, et discutés en détail dans la section 3.4. L'expression de VP1 seule résulte plutôt en la formation d'agrégats de grande taille dans le noyau (Lombardo *et al.*, 2002). Selon l'analyse de la structure, il est probable que la présence de trop de protéines VP1, avec leur prolongement d'environ 150 aa, empêche l'assemblage correct en capsid.

1.6 Cycle de réplication

Le cycle de réplication du PPV est relativement rapide. En culture cellulaire, où les cellules sont en division active, on peut observer les capsides nouvellement formées au noyau aussi tôt que 12h après l'infection (p.i., « post infection »). Il est possible de détecter les virus nouvellement produits dans le surnageant aussi tôt que 16h p.i. et les effets cytopathiques sont clairement visibles à 24h p.i.. Un schéma global du cycle de réplication est présenté à la figure 1.8, et les différentes étapes sont expliquées dans les sections suivantes.

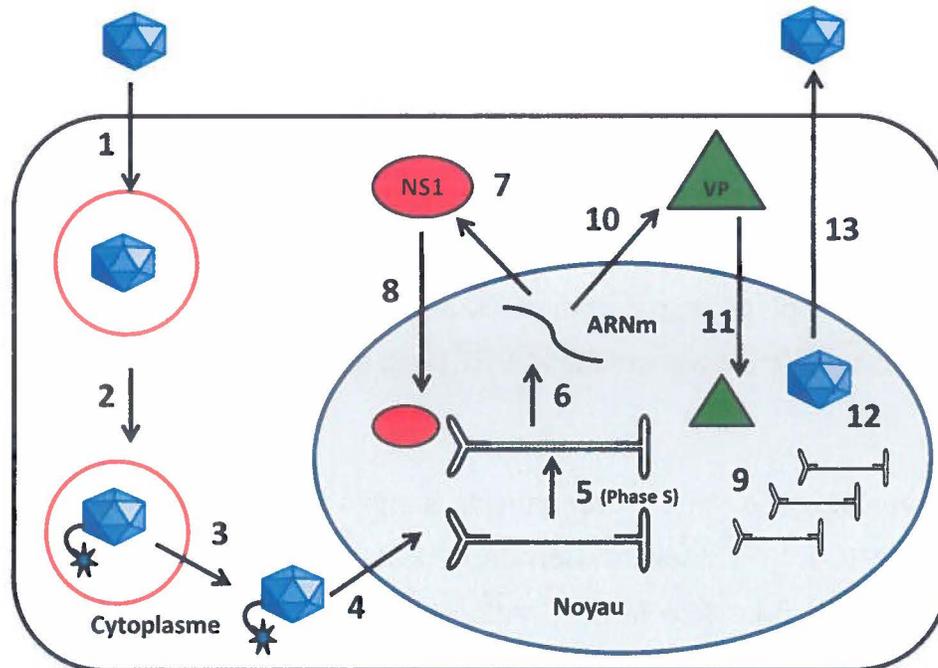


Figure 1.8. Cycle de réplication du PPV

Le cycle de réplication des parvovirus autonomes débute par l'entrée du virus dans la cellule (1). Une fois dans la voie endosomale, des changements de conformations (2) mènent à l'externalisation de la région N-terminale de VP1, qui contient l'activité enzymatique de phospholipase virale, permettant l'évasion de la voie endosomale (3). Ensuite, le virus livre son génome au noyau, par un mécanisme encore peu connu (4). Lorsque la cellule passe en phase S du cycle cellulaire, le génome simple brin est converti en ADN double brin (5), ce qui permet la traduction (6) et la production de la protéine non structurale NS1 (7). NS1 retourne au noyau (8) et est responsable, entre autres de l'amplification du génome viral (9) et de la production des protéines structurales (VP, 10). Les protéines structurales sont transportées au noyau sous la forme de trimères (11). Les trimères s'assemblent en capsides, et le génome y est inséré (12). Finalement, les virions complets sont exportés de la cellule, et la cellule est détruite par les effets cytopathiques (13).

1.6.1 Étapes précoces

Les étapes précoces d'une infection virale débutent par l'interaction entre le virus et la cellule hôte et se terminent à la livraison du génome viral dans le compartiment cellulaire approprié pour la réplication. Lors du début de ce projet, peu d'information était disponible concernant les mécanismes utilisés par le PPV lors des étapes précoces de l'infection.

Chez les membres du genre *Protoparvovirus*, plusieurs récepteurs cellulaires ont été identifiés et sont une composante importante de la détermination du tropisme des virus. Un bon exemple est le parvovirus félin (FPV) qui utilise le récepteur de la transferrine (TfR) pour son entrée dans la cellule (Parker *et al.*, 2001). Lors de l'évolution du FPV vers le parvovirus canin (CPV-2), le virus a acquis quelques mutations à la surface de sa capsid (K93N et D323N), lui permettant de se lier au TfR canin, mais plus au récepteur félin (Hueffer *et al.*, 2003a). Par la suite, quelques autres mutations sont apparues (M87L, I101T, A300G, D305Y, V555I), permettant l'émergence du CPV-2a, un virus capable de lier les TfR canin et félin (Truyen *et al.*, 1996, Truyen *et al.*, 1992).

D'autres exemples de récepteurs des parvovirus sont l'antigène P des érythrocytes et l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ pour B19 (Brown *et al.*, 1993, Weigel-Kelley *et al.*, 2003), et les acides sialiques pour MVM et BPV (Johnson *et al.*, 2004, Lopez-Bueno *et al.*, 2006). Le récepteur spécifique du PPV demeure à ce jour inconnu.

L'attachement du virus à son récepteur permet d'activer les mécanismes d'endocytose. Les travaux effectués avec plusieurs parvovirus ont montré que la plupart utilisent l'endocytose via les vésicules de clathrine (Figure 1.9, gauche) (Dudleenamjil *et al.*, 2010, Parker *et al.*, 2000, Quattrocchi *et al.*, 2012, Vendeville *et al.*, 2009). Ce processus hautement spécifique dépend de l'attachement au récepteur, et procède par

une invagination de la membrane cellulaire qui sera progressivement recouverte d'une cage de clathrine (McMahon *et al.*, 2011). Cette cage est constituée de protéines assemblées d'abord en triskèle (trois protéines) qui sont ensuite dirigées vers la membrane et la cage se forme directement autour de la vésicule naissante grâce à plusieurs protéines adaptatrices. Finalement, la protéine dynamine permettra le détachement de la vésicule et son relâchement dans le cytoplasme.

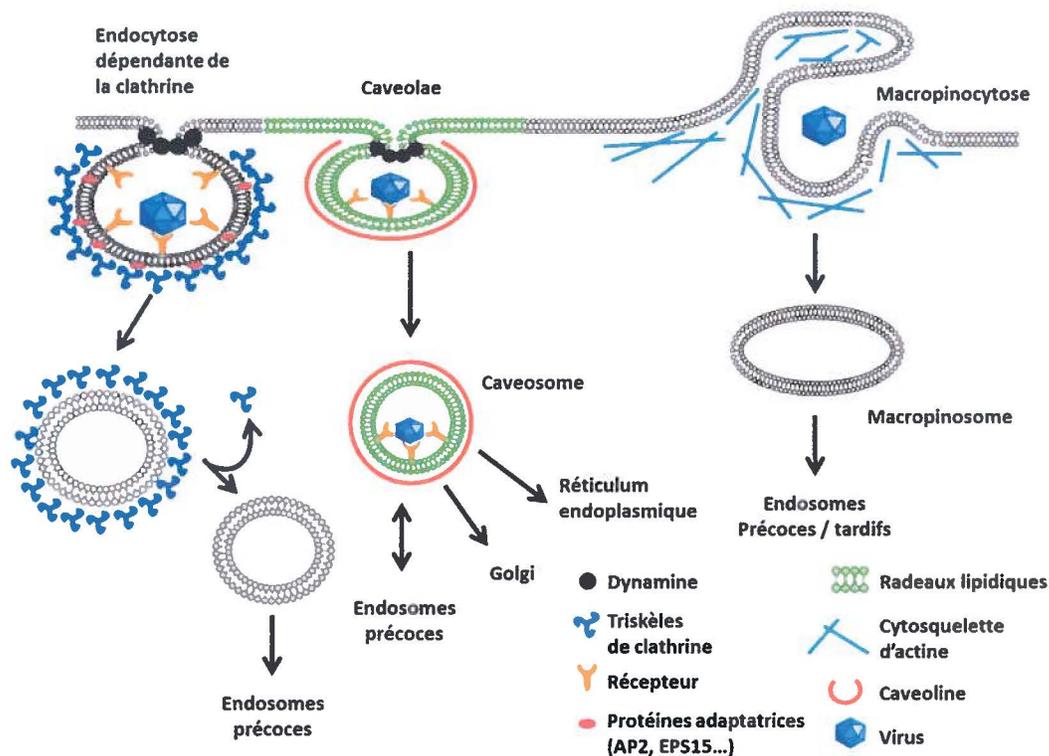


Figure 1.9. Principaux mécanismes d'endocytose

Les trois mécanismes les plus connus pour l'endocytose des virus non enveloppés sont l'endocytose dépendante de la clathrine (gauche), l'endocytose via les caveolae (milieu) et la macropinocytose (droite). L'endocytose dépendante de la clathrine commence avec l'attachement à un récepteur spécifique, est caractérisée par la formation d'une cage de clathrine autour de la vésicule en formation et dépend de la dynamine pour fermer la vésicule. L'endocytose via les cavéolae dépend de l'attachement à un récepteur spécifique, procède au niveau des radeaux lipidiques, la vésicule est associée à la protéine cavéoline et est détachée par la dynamine. La macropinocytose est un mécanisme non spécifique, caractérisé par la polymérisation de microfilaments d'actine, créant des projections membranaires qui provoqueront la formation de vésicules, appelées macropinosomes. Dans tous les cas, les vésicules formées peuvent interagir avec la voie endosomale. Adapté de Boisvert *et al.*, 2012

Malgré l'utilisation commune de ce mécanisme d'endocytose, certains parvovirus ont la capacité d'utiliser un mode d'entrée alternatif qui semble spécifique au virus étudié. Le dépendovirus AAV de type 5 utilise alternativement l'endocytose via les caveolae (Figure 1.9, centre) (Bantel-Schaal *et al.*, 2009). Ce mode d'entrée dépend aussi de l'attachement à un récepteur spécifique, mais se situe au niveau des radeaux lipidiques (Kiss *et al.*, 2009, Lajoie *et al.*, 2007). Ces zones de la membrane cellulaire sont enrichies en cholestérol et sphingolipides. La cavéoline est une protéine importante de ce mode d'endocytose, et elle se lie au cholestérol. L'homéostasie du cholestérol est donc essentielle à ce mode d'entrée.

Le dépendovirus AAV-2 utilise un mode d'entrée alternatif récemment identifié. Ce mode d'entrée est indépendant de la clathrine et de la cavéoline. Sa caractérisation a montré que l'entrée a lieu dans les radeaux lipidiques, dépend de l'action des protéines GRAF-1, Arf1 et Cdc42 (Lundmark *et al.*, 2008, Nonnenmacher *et al.*, 2011). La polymérisation de l'actine est aussi importante pour la formation de la vésicule.

Un autre mode d'entrée possible est la macropinocytose (Figure 1.9, droite) (Mayor *et al.*, 2007, Swanson *et al.*, 1995). Ce mécanisme d'endocytose est apparenté à la phagocytose, mais est possible dans la plupart des types cellulaires, suite à une activation. Une fois activé, ce mode d'entrée ne dépend pas de l'attachement à un récepteur comme les autres mécanismes décrits ci-haut. Pour l'Adénovirus de type 5 la macropinocytose est activée suite à la liaison du virus sur son récepteur et est responsable de l'entrée de plusieurs particules virales (Meier *et al.*, 2004).

Une fois dans la cellule, et ce, peu importe le mode d'entrée choisi, le virus se retrouve dans une vésicule qui va progresser dans la voie endosomale, ou qui va minimalement interagir avec celle-ci (Jovic *et al.*, 2010, Mayor *et al.*, 2007). La voie endosomale est constituée de vésicules dont le pH s'acidifie progressivement et qui se déplacent le long des microtubules vers le noyau (Figure 1.10) (Driskell *et al.*, 2007,

Huotari *et al.*, 2011). Les endosomes précoces ont un pH légèrement acide (6 à 7) et représentent le lieu de tri des molécules endocytées. Le contenu peut être ciblé vers les vésicules de recyclage et retourné à la surface cellulaire, ou acheminé vers le Golgi. Alternativement, le contenu qui demeure dans les endosomes précoces progressera vers les endosomes tardifs, plus acides (pH : 5-6), et finalement vers les lysosomes, dans un environnement encore plus acide (pH<5) qui contient aussi plusieurs protéases dont le rôle est de détruire le contenu de la vésicule. Cependant, tel que mentionné plus haut, la capsidie des parvovirus est résistante à l'environnement acide de la voie endosomale, et le virus peut demeurer assez longtemps dans celle-ci sans être détruit. Par exemple, le parvovirus canin CPV a été détecté dans les lysosomes (M. Vihinen-Ranta *et al.*, 2000). En fait, ce changement d'environnement est utilisé par les virus pour activer des changements de conformation dans la capsidie afin de permettre la suite de l'infection.

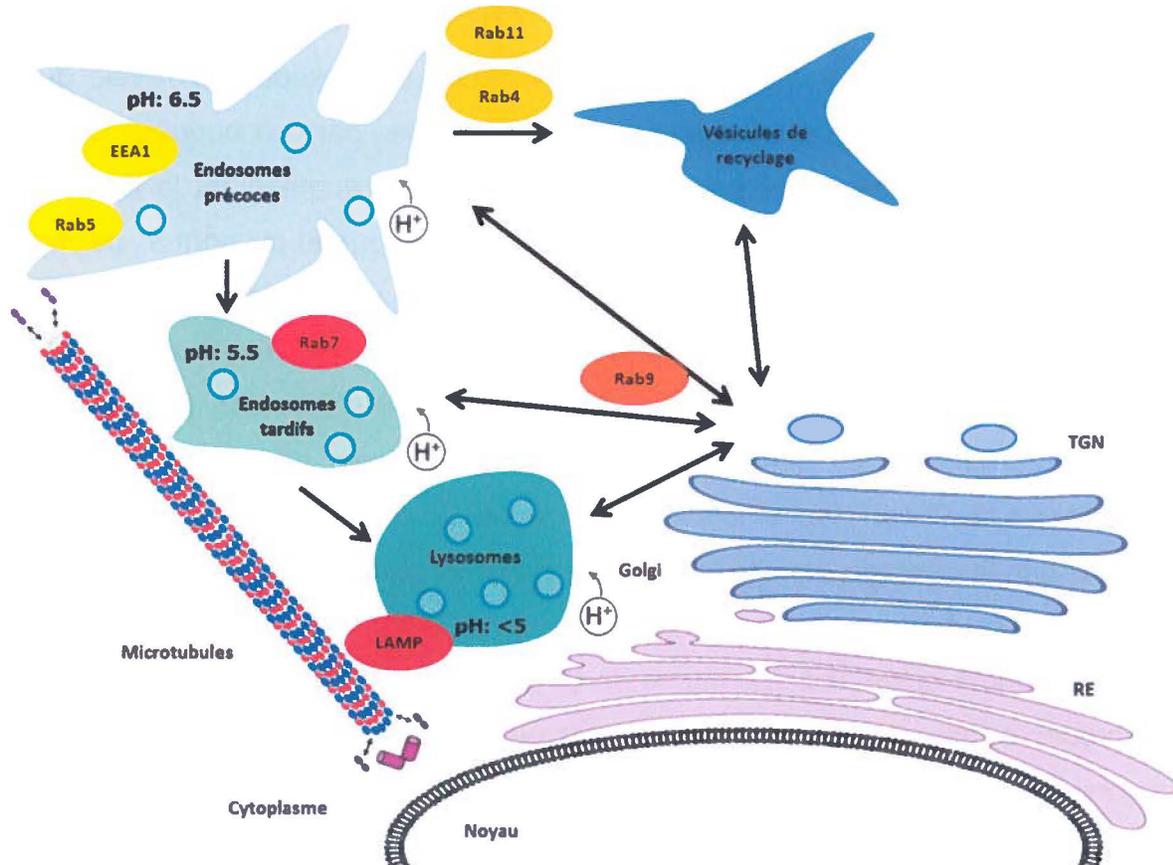


Figure 1.10. Voie endosomale

La voie endosomale est constituée d'un ensemble de vésicules portant des marqueurs de surface spécifiques (principalement les protéines Rab), importants pour leurs fonctions. Le contenu extracellulaire endocyté se retrouvera d'abord dans les endosomes précoces, où une étape de tri déterminera quel contenu ira vers les vésicules de recyclage et retournera à la surface, ira vers d'autres organelles (ex : Golgi) ou procédera plus loin dans la voie endosomale vers les endosomes tardifs et les lysosomes. Les vésicules s'acidifient peu à peu grâce aux pompes à protons dans leur membrane. Les vésicules se déplacent aussi vers le noyau par transport rétrograde sur les microtubules. Adapté de Boisvert *et al.*, 2012

Chez les parvovirus, il y aura clivage progressif des protéines majoritaires VP2 en VP3, ce qui permet de créer de l'espace dans le pore de l'axe de symétrie 5 (Bleker *et al.*, 2005, Tullis *et al.*, 1992). Cet espace accru est important pour l'externalisation de la région N-terminale de la protéine minoritaire VP1 qui ne sera pas clivée (Farr *et al.*, 2006, Sanchez-Martinez *et al.*, 2012). Cette région unique de VP1 est essentielle à l'infection, notamment grâce à la phospholipase virale qui permet l'évasion du virus de la voie endosomale vers le cytoplasme pour se rendre au noyau (Farr *et al.*, 2005).

L'externalisation de la région unique de VP1 de AAV a été étudiée récemment (Venkatakrisnan *et al.*, 2013). L'analyse informatique de la séquence révèle que la structure est composée de plusieurs hélices alpha, reliées par des boucles. De façon remarquable, ces hélices alpha se déforment à pH acide, augmentant la flexibilité et permettant l'externalisation dans la voie endosomale, le retour au pH normal, permet de reformer les hélices- α , reformant la structure normale. Ce modèle intéressant demeure en conflit avec la nécessité de l'activité de la PLA₂ pour l'évasion de la voie endosomale. En effet, la PLA₂ est beaucoup plus active à pH neutre (Canaan *et al.*, 2004). Il y aurait donc un conflit entre l'externalisation, plus efficace à pH acide et l'utilisation de la PLA₂, plus efficace à pH neutre. Il a été observé pour plusieurs parvovirus que le passage dans la voie endosomale est relativement lent, pouvant durer 6-8 heures. Il est fort possible que l'activité faible de la PLA₂ mieux externalisée dans un environnement acide soit une cause de ce passage lent vers le cytoplasme. Il est aussi probable qu'une partie du virus entrant ne réussisse pas à s'évader de la voie endosomale, participant au rapport génome : virus infectieux particulièrement élevé des parvovirus. Le transport dans la voie endosomale est tout de même doublement bénéfique pour le virus puisqu'il permet les changements de conformation essentiels aux étapes subséquentes d'infection et qu'il assure un transport dirigé, le long des microtubules, vers le noyau, lieu ultime du transport du génome viral (Driskell *et al.*, 2007).

La dernière portion des étapes précoces chez les parvovirus consiste à libérer le génome dans le noyau. Ces étapes sont très peu décrites dans la littérature pour les parvovirus. Théoriquement, la capsid de 18-26nm serait suffisamment petite pour passer intacte dans le complexe de pore nucléaire (Pante *et al.*, 2002). Alternativement, comme c'est le cas des virus trop gros pour entrer entier dans le noyau, la capsid peut se positionner au pore nucléaire et relâcher seulement le génome dans le noyau. Une des limitations rencontrées lors des études des étapes précoces chez les parvovirus est le fait que le rapport particules infectieuses : particules totales est particulièrement bas. Chez le PPV nous avons observé que ce rapport est entre 1 :5 000 et 1 :10 000. Donc, ce que nous observons lors d'expériences en immunofluorescences (IF) pour les

étapes précoces est largement influencé par ces particules non infectieuses. Il est possible qu'une seule capsidienne entre au noyau et permette la réplication virale sans que nous puissions la détecter. Des travaux effectués suite à l'infection par AAV ont montré que la majorité du signal de la capsidienne en IF demeure à l'extérieur du noyau lors des étapes précoces (Lux *et al.*, 2005). De plus, malgré le fait qu'on puisse observer des capsidies dans le noyau à forte MOI, l'utilisation de moins de particules virales pour l'infection a permis de montrer qu'il est possible de détecter de l'ADN au noyau, et ce, sans détecter de capsidies au noyau, suggérant la livraison du génome seulement, sans la capsidienne. Le même type d'observation a été effectué pour l'infection par le parvovirus humain B19 (Quattrocchi *et al.*, 2012). Bien qu'une grande quantité d'ADN ait été détectée au noyau, le signal de la capsidienne est demeuré cytoplasmique. Il ne faut cependant pas oublier qu'il est possible que des changements de conformation, ou des modifications de la capsidienne nécessaires à l'entrée de la capsidienne au noyau empêchent sa détection au noyau.

De plus, dans le cas des parvovirus, il est possible que la phospholipase ait un effet non seulement sur la membrane endosomale, mais aussi sur la membrane nucléaire. Des bris de la membrane nucléaire ont été observés en microscopie électronique lors de l'infection par MVM (Cohen *et al.*, 2005). Cependant, ces bris de la membrane nucléaire suite à l'infection par MVM ne sont pas dus à l'action de la phospholipase, mais plutôt au recrutement de la caspase 3 (Cohen *et al.*, 2011). L'infection provoque rapidement des bris dans la membrane nucléaire et le clivage de la lamine B2. Ces bris sont cependant transitoires et l'apoptose n'est pas activée. L'inhibition de la caspase 3 avant l'infection diminue la quantité de cellules exprimant la protéine virale NS1 qui est un bon marqueur du succès de la réplication virale. Donc, la livraison du génome au noyau par les parvovirus demeure une étape peu connue et controversée. Plus récemment les auteurs ont montré que les bris de l'enveloppe nucléaire se font par les enzymes normalement impliquées dans la mitose (Porwal *et al.*, 2013). Le virus s'attache directement au complexe de pore nucléaire. Ensuite, la perméabilisation de la membrane par la phospholipase virale apporte un flux de calcium provenant de l'espace entre la double membrane nucléaire. Ce flux active la protéine

PKC α , qui phosphoryle la lamine et active la protéine Cdk-2, qui est encore plus activée par l'action de la caspase 3. Cdk-2 activée (élément clé lors de la mitose) peut à son tour activer la protéine Cdk-1 et ceci cause l'hyperphosphorylation de la lamine, causant sa désintégration.

1.6.2 Étapes intermédiaires

Le génome livré au noyau lors de l'infection par un parvovirus est composé d'un ADN simple brin négatif à partir duquel la transcription est impossible. Les parvovirus ne possèdent pas non plus de polymérase virale. Ce sont les facteurs cellulaires présents lors de la phase S du cycle cellulaire qui synthétiseront le 2^e brin d'ADN à l'aide des structures en épingle à cheveux qui servent d'amorce pour la polymérase (Figure 1.11 étape 1) (Bourguignon *et al.*, 1976). Les parvovirus utilisent la polymérase δ et ses cofacteurs, actifs lors de la phase S du cycle cellulaire (Bashir *et al.*, 2000). Puisque le virus qui ne peut pas activer celle-ci, il peut seulement infecter productivement une cellule en division active (Bashir *et al.*, 2000). Ceci explique la forte réplication du virus dans plusieurs organes et tissus chez les fœtus.

Une fois que le génome simple brin est converti en intermédiaire de réplication monomérique (mRF, ADN double brin, une longueur de génome), la transcription devient possible. La transcription est d'abord initiée au promoteur précoce (p4, Figure 1.10. étape 2), permettant la synthèse des protéines non structurales (Deleu *et al.*, 1999). La synthèse de la protéine NS1 est une étape clé de la réplication puisque cette protéine multifonctionnelle est essentielle pour la réplication du génome viral, qui procède par un mécanisme « d'épingle roulante » (rolling hairpin (Tattersall *et al.*, 1976)). De retour au noyau, NS1 va procéder à une cassure simple brin, site spécifique, sur l'ADN au niveau de l'épingle à cheveux de droite, créant une fourche de réplication (Figure 1.11, étape 3). NS1 demeurera attaché de façon covalente à l'extrémité 5' de l'ADN clivé (Cotmore *et al.*, 1993, Cotmore *et al.*, 1988), et restera lié à l'ADN à l'extérieur de la capsid après l'assemblage (Cotmore *et al.*, 1989). NS1 a aussi une activité hélicase qui va permettre de dérouler les structures en épingle à cheveux. Ce

déroulement du génome par NS1 combiné avec l'action de la polymérase cellulaire mène à la formation de l'intermédiaire de réplication dimérique (dRF, ADN double brin, double longueur de génome, Figure 1.11, étapes 4-6) (Cotmore *et al.*, 1992). La réplication du génome procédera ensuite par une succession de cassure crée par NS1, polymérisation et libération des génomes simple brin accumulant ainsi les copies de génome.

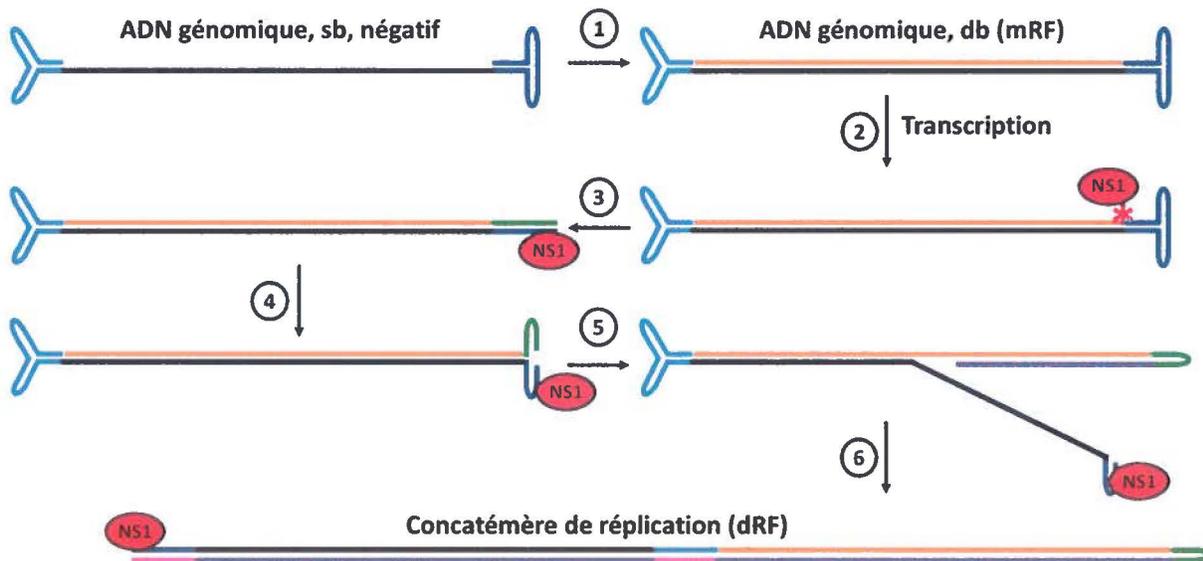


Figure 1.11. Amplification du génome des parvovirus

La réplication du génome des parvovirus débute par la conversion du génome entrant (noir, épingle à cheveux en bleu pâle et bleu foncé) en génome double brin (ADN nouvellement synthétisé en orange, étape 1). Cet intermédiaire permet le début de la transcription, et la production de la protéine non structurale NS1 (étape 2). NS1 crée une cassure simple brin dans l'ADN (*), et déroule l'épingle à cheveux de droite (étape 3, épingle à cheveux nouvellement synthétisée en vert). Les épingle à cheveux sont ensuite séparées et repliées (étape 4). La nouvelle épingle à cheveux permet l'initiation de la réplication de l'ADN, et le génome est graduellement déroulé par NS1 (étape 5, nouveau brin en mauve, et nouvelles épingle à cheveux en rose, étape 6). Des concatémères de différentes longueurs sont alors générés. Les copies du génome seront excisées grâce à NS1 et insérées dans les capsides préformées. Figure inspirée de (Cotmore *et al.*, 1995).

1.6.3 Étapes tardives

La protéine NS1 a aussi la capacité d'activer le promoteur tardif (p40), permettant la production des protéines structurales VP1 et VP2 (Bergeron *et al.*, 1993, Rhode, 1985a, Rhode, 1985b, Rhode *et al.*, 1987). Celles-ci sont rapidement

assemblées en trimère, qui est plus stable que la protéine seule. Ces trimères sont ensuite rapidement transportés au noyau, si bien que des expériences d'IF montrent très peu de protéines structurales au cytoplasme alors que l'accumulation au noyau est bien visible. L'assemblage des trimères en capsid se fait au noyau et le génome est ensuite inséré dans celle-ci encore une fois grâce à l'activité hélicase de NS1 (Cotmore *et al.*, 2005a). La production de copies de génome (ADN simple brin prêt à être encapsidé) est étroitement liée à la disponibilité des capsides au noyau (Hardt *et al.*, 1983, Miller *et al.*, 2002). Ainsi, si l'association des protéines structurales en capsid est inhibée, il y aura peu de réplication du génome et peu de production de génome.

La plupart des genres de la famille *Parvoviridae* possèdent des séquences terminales identiques, repliées en épingle à cheveux de même structure. Cependant, le genre *Protoparvovirus* est unique puisque les séquences terminales sont différentes en séquence et leur repliement forme des structures distinctes. De plus, alors que les autres genres peuvent encapsider les deux brins d'ADN (positif et négatif) à fréquence équivalente, les *Protoparvovirus* comme MVM ou PPV encapsident préférentiellement le brin de polarité négative. Les séquences importantes pour ce phénomène se situent dans l'épingle à cheveux de droite (Cotmore *et al.*, 2005b). Cette encapsidation préférentielle provient du fait que la coupure simple brin, effectuée par NS1 est plus efficace d'un côté du génome que l'autre, relâchant et accumulant les brins de polarité négative (Cotmore *et al.*, 2005b).

L'utilisation de divers mutants pour plusieurs parvovirus a montré que l'absence de transport au noyau de VP2 empêche la formation de capsid (Lombardo *et al.*, 2002). Même lorsqu'il y a une accumulation importante de protéines au cytoplasme, assemblées en trimères, et que les mutations n'affectent pas les contacts entre les trimères, il n'y a pas de capsid formée au cytoplasme. Certains facteurs, présents seulement au noyau, semblent donc essentiels à l'assemblage.

Les virions complétés seront ensuite activement exportés du noyau et de la cellule, via l'action de NS2 (Eichwald *et al.*, 2002, Miller *et al.*, 2002). On peut détecter l'accumulation de virus infectieux dans le surnageant des cellules infectées avant l'apparition des effets cytopathiques. Chez MVM, la protéine NS2 s'associe avec la protéine d'export nucléaire CRM-1 (exportine-1), et une mutation empêchant cette interaction diminue grandement l'export de la capsidie lors de l'infection tardive (Miller *et al.*, 2002). De plus, pour le MVM que le mécanisme d'export de la capsidie dépend du type cellulaire (Maroto *et al.*, 2004). Dans des cellules humaines transformées, l'export dépend de la phosphorylation de résidus sérines dans la région N-terminale de VP2, et est indépendant de la protéine CRM-1, membre de la voie d'export classique. Dans des cellules murines non transformées, des mutants non phosphorylés peuvent utiliser la voie classique dépendante de CRM-1.

La région N-terminale de VP2 est d'abord située à l'intérieur de la capsidie lors de l'assemblage. Puis, lors de l'insertion du génome dans la capsidie, la région N-terminale de VP2 est externalisée (Agbandje-McKenna *et al.*, 1998, Chapman *et al.*, 2006). Ce changement de conformation est possible en partie grâce à une région riche en glycine permettant la flexibilité nécessaire (Castellanos *et al.*, 2013). Ce processus ingénieux permet d'exposer la séquence nécessaire à l'export nucléaire seulement lorsque le virus nouvellement formé est complet et prêt à procéder à l'infection d'une nouvelle cellule. L'export chez le MVM est très efficace, puisque le marquage avec un anticorps spécifique de la région N-terminale de VP2 apparaît à 22h p.i., et disparaît rapidement à 24h p.i. (Maroto *et al.*, 2004). Cet export actif survient avant la lyse de la cellule. Il est intéressant de noter que le PPV contient seulement une sérine dans la région N-terminale de VP2, et donc les mécanismes d'export de la capsidie pourraient être différents pour ce virus.

La sortie du noyau dépend de la protéine cellulaire gelsoline avant de se rendre à la membrane plasmique (Bar *et al.*, 2008). L'inhibition de l'expression de cette protéine, impliquée dans le clivage des chaînes du réseau d'actine, bloque le transport

du virus du noyau vers la membrane cellulaire. Plus récemment, ce transit a été étudié plus en détail (Bar *et al.*, 2013). Les auteurs ont montré que les capsides passent par le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Ce passage permet la maturation de la capside par phosphorylations, rend le virus plus infectieux et aide l'efficacité de la cytolysse. Les virus sont ensuite transportés dans des vésicules contenant la protéine COPII et dépend aussi des protéines sar1, sec24, rab1, radixin et moesin. Ultiment, les effets cytotoxiques de NS1 et NS2 mèneront à la mort et la lyse de la cellule infectée, relâchant une grande quantité de virus (Caillet-Fauquet *et al.*, 1990, Nuesch *et al.*, 2005).

1.7 Interactions virus-cellule

Il est bien connu que les virus, parasites obligatoires, doivent interagir avec une cellule afin de compléter leur cycle de réplication. Les parvovirus sont un bon exemple de grande dépendance des fonctions cellulaires. Leur génome de seulement environ 5000 bases permet la production d'un nombre limité de protéines. Les parvovirus exploitent la cellule pour leur transport au noyau, pour la modification de leur génome en un génome double brin, pour produire leurs protéines, amplifier leur ADN, et exporter les nouveaux virus hors de la cellule (Miller *et al.*, 2002). De plus, certains virus utilisent des protéines cellulaires comme chaperonnes pour l'assemblage des capsides (Qiu *et al.*, 1999). L'utilisation de protéines chaperonnes nucléaires expliquerait au moins en partie pourquoi les protéines structurales sont transportées au noyau sous la forme de trimères et que la capside est assemblée seulement au noyau. Par exemple, le dependovirus AAV2 s'associe avec la protéine nucléoline lors de l'assemblage des nouvelles particules virales (Qiu *et al.*, 1999) Alors que le CPV utilise les caspases cellulaires afin de créer des bris dans la membrane nucléaire (Cohen *et al.*, 2011).

1.7.1 Altérations du cytosquelette de la cellule

Le cytosquelette des cellules est composé de plusieurs réseaux de protéines assurant non seulement l'architecture de la cellule, mais ayant aussi des fonctions dans le transport des protéines. Il existe principalement trois types de structures du cytosquelette dans les cellules. Les microfilaments d'actines (Figure 1.12 A) forment des fibres qui traversent la cellule de part et d'autre et ont des fonctions autant statiques (structure des microvillosités de l'épithélium intestinal) que dynamiques (migration cellulaire, contraction musculaire, phagocytose (Burnette *et al.*, 2011, May *et al.*, 2001)). Le transport le long des filaments d'actine est assuré par la protéine motrice myosine. Les filaments intermédiaires (Figure 1.12 B) sont ancrés d'une part à la membrane plasmique et d'autre part à la membrane nucléaire et ils sont l'unité structurale stable de la cellule (Herrmann *et al.*, 2007).

Les microtubules (Figure 1.12 C) sont plutôt spécialisés dans le transport vers le noyau et du noyau vers la membrane (Leopold *et al.*, 2006). En effet, les microtubules sont ancrés au centre d'organisation des microtubules situé près du noyau. De là, leur polymérisation se fait dans toutes les directions vers la membrane plasmique. De plus, le transport sur les microtubules est directionnel. En effet, il existe deux types de protéines motrices qui parcourent les microtubules : la dynéine assure le transport spécifiquement vers le noyau et la kinésine assure le transport spécifiquement vers la membrane plasmique. Ce réseau est aussi impliqué dans la maturation des vésicules de la voie endosomale, qui se dirigent peu à peu vers le noyau (Driskell *et al.*, 2007, Huotari *et al.*, 2011). Ainsi les endosomes précoces sont situés surtout en périphérie, et les lysosomes sont plutôt situés près du noyau. Les microtubules sont souvent utilisés par les virus autant pour livrer le génome au noyau en début d'infection que pour l'export des particules virales en fin d'infection. Les microtubules et les microfilaments d'actine sont particulièrement dynamiques, et constamment réorganisés par polymérisation/dépolymérisation selon les besoins. Au contraire, les filaments

intermédiaires sont relativement stables et, malgré une certaine plasticité, leur structure change peu et ils ne sont pas polarisés.

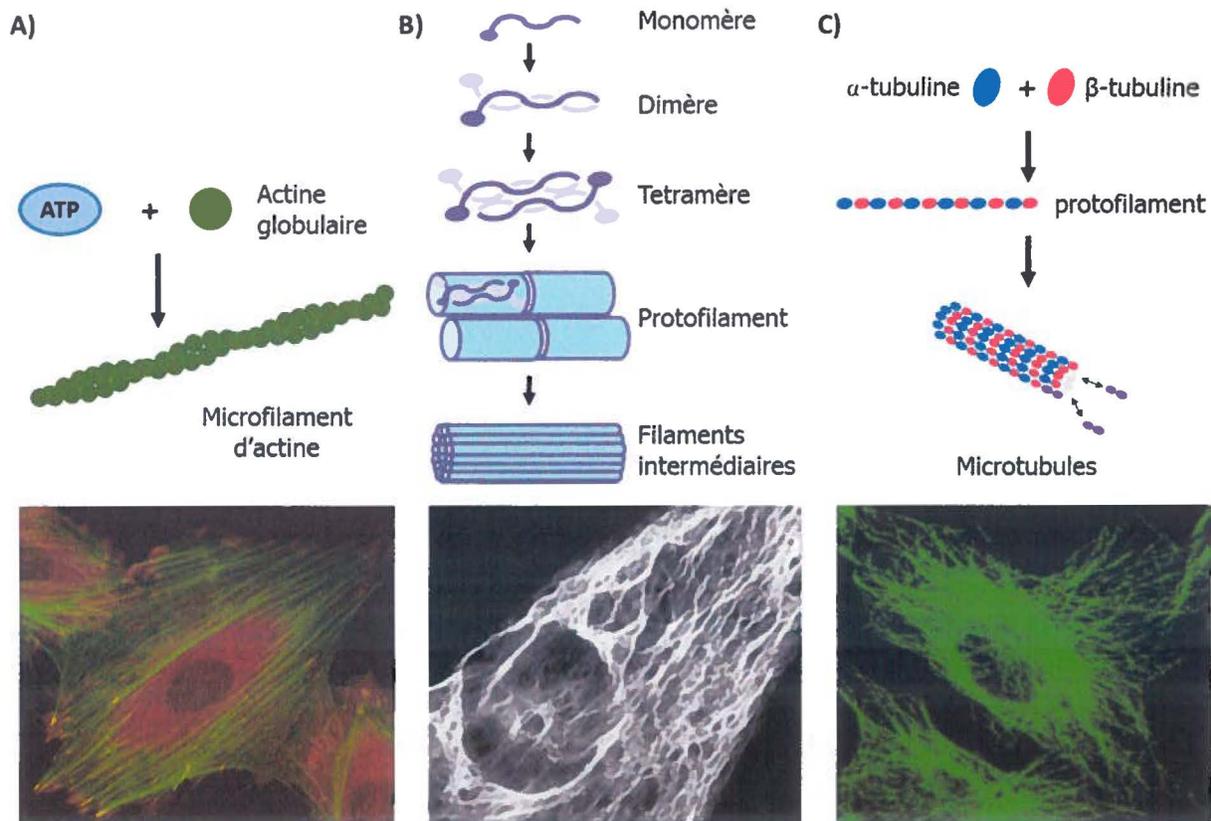


Figure 1.12. Cytosquelette cellulaire

Trois composantes principales du cytosquelette. A) Les microfilaments d'actine sont formés par la polymérisation de l'actine globulaire. L'association des monomères avec l'ATP favorise la polymérisation. B) Les filaments intermédiaires peuvent être composés de plusieurs protéines selon le type cellulaire. La vimentine est une protéine de filaments intermédiaires très répandue et est présente par exemple, dans les fibroblastes et cellules endothéliales. Les filaments sont formés d'abord par l'association de vimentine en dimères. Ils s'associent ensuite en tétramères et protofilaments avant de former la structure finale. C) Les microtubules sont construits par l'assemblage d'hétérodimères de tubuline α et β . Leur association en chaîne forme un protofilament. 13 protofilaments s'associent pour former le tube caractéristique des microtubules. (Dessins par Maude Bolsvert, image confocale A et C par Maude Boisvert et B tiré de (Shemiakina *et al.*, 2012))

L'infection par les parvovirus est lytique. On peut facilement observer les effets de l'infection : les cellules s'arrondissent et se détachent de leur support et finissent par éclater. Ce sont les effets cytopathiques facilement identifiables d'une culture cellulaire infectée. Des travaux effectués avec le protoparvovirus MVM ont montré que l'infection mène à la réorganisation et la destruction des filaments d'actine et des filaments

intermédiaires de vimentine (Nuesch *et al.*, 2005). L'altération des filaments d'actine se fait par la diminution de la protéine WASP, un activateur de la machinerie de polymérisation et par l'augmentation de l'expression de la gelsoline, un régulateur négatif, impliquée dans la dépolymérisation. À l'opposé, le réseau de microtubules demeure intact pendant toute l'infection. Ce réseau semble même activement protégé par l'infection, puisque le traitement avec l'agent dépolymérisateur nocodazole n'affecte pas les microtubules s'il est ajouté lors des étapes tardives de l'infection (16 h p.i., (Nuesch *et al.*, 2005)). Cette protection est assurée par la phosphorylation des microtubules par la protéine kinase C (PKC), qui permet la stabilisation du réseau. Le noyau demeure aussi intact tout au long de l'infection, permettant l'assemblage des nouvelles particules virales lors des étapes tardives (Nuesch *et al.*, 2005).

1.7.2 Protéasome

Une autre composante cytoplasmique potentiellement impliquée dans la réplication virale est le protéasome. Le protéasome est un complexe protéique dont la fonction est de dégrader les protéines qui y sont ciblées permettant l'élimination de protéines et le recyclage d'acides aminés (Hendil *et al.*, 2004). Le protéasome est situé autant au noyau qu'au cytoplasme et est notamment utilisé pour éliminer des protéines défectueuses qui pourraient être toxiques pour la cellule (von Mikecz, 2006). Les protéines devant être dégradées par le protéasome sont généralement marquées par la polyubiquitination (Kornitzer *et al.*, 2000). L'ubiquitine est une petite protéine qui est ajoutée à la protéine cible via l'attachement à une lysine. Une mono-ubiquitination (ajout d'une seule ubiquitine) est plutôt associée à un signal pour la localisation d'une protéine, ou est associée à l'endocytose. La polyubiquitination (ajout d'une chaîne de plusieurs ubiquitines) est associée au transport de la protéine au protéasome et à sa dégradation. Le protéasome peut cependant être positif pour une protéine. C'est le cas pour la production du facteur de transcription NF- κ B (Palombella *et al.*, 1994). Ce facteur est un hétérodimère composé des sous-unités p50 et p65. La sous-unité p50 provient de la protéine p105 dont la maturation dépend du protéasome (Lin *et al.*, 1996, Moorthy *et al.*, 2006). Cette maturation consiste au clivage après une séquence riche

en glycines, relâchant la sous-unité p50 et menant à la dégradation de la portion C-terminale de la protéine p105 (Figure 1.13).

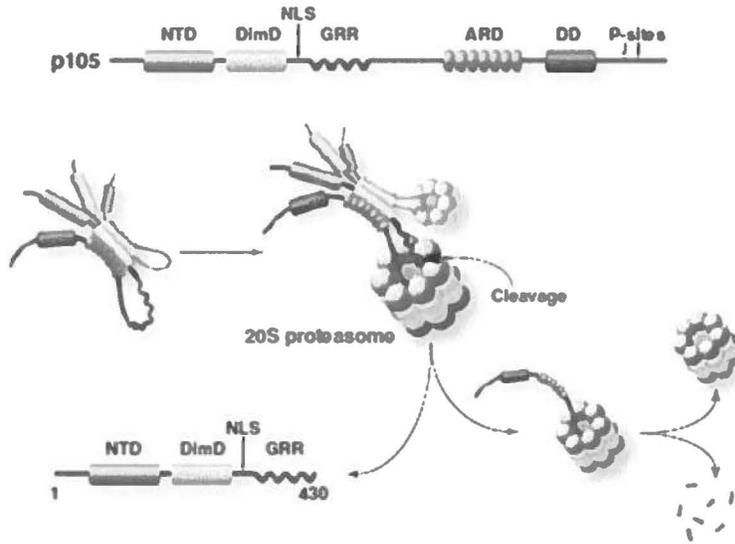


Figure 1.13. Génération de la sous-unité p50 du facteur NF-κB
 La sous-unité p50 est produite grâce au clivage de son précurseur p105 par le protéasome, dégradant la partie C-terminale, et relâchant la sous-unité p50 intacte (tiré de (Moorthy et al., 2006)).

Lors d'une infection virale, la destruction de la capside par le protéasome dans le cytoplasme pourrait empêcher la livraison du génome au noyau et donc inhiber l'infection. À l'opposé, le protéasome pourrait faire partie des changements de conformation de la capside essentiels à l'infection. Aussi, le virus pourrait utiliser le protéasome pour éliminer des protéines cellulaires aux fonctions antivirales. Plusieurs virus dépendent de l'activité du protéasome pour l'établissement de l'infection. Par exemple, pour le virus Herpes Simplex, l'inhibition du protéasome empêche le transport correct du virus vers le noyau (Delboy *et al.*, 2008). En effet, le virus peut toujours entrer sans la cellule, mais l'accumulation en périphérie du noyau est alors beaucoup moins efficace. Les *Orthopoxvirus* sont de grand virus dont la réplication se fait complètement au cytoplasme via la formation d'usines virales. L'inhibition de l'activité du protéasome empêche la formation de ces usines virales (Teale *et al.*, 2009). Alors, bien que la production des protéines virales précoces soit normale, la réplication du

génomique ainsi que la production des protéines tardives sont alors altérées, bloquant la production de nouveaux virus.

Chez les parvovirus, le protéasome inhibe l'infection par AAV (*Dependoparvovirus*), empêchant la livraison du génome au noyau (Douar *et al.*, 2001). Cependant, l'action du protéasome est essentielle pour l'infection par le protoparvovirus MVM (Ros *et al.*, 2002, Ros *et al.*, 2004). L'inhibition du protéasome tôt durant l'infection bloque l'établissement de l'infection. Le protéasome n'est toutefois pas impliqué dans le clivage de VP2 en VP3, ni dans l'externalisation de la région unique de VP1. Des expériences d'immunofluorescence ont aussi montré que, lors de l'inhibition du protéasome, les capsides virales s'accumulent d'un côté du noyau, et il n'y a pas de colocalisation avec les marqueurs de la voie endosomale ni avec le Golgi. Les capsides semblent donc libres dans le cytoplasme, mais incapables de livrer leur génome au noyau (Ros *et al.*, 2004).

2 COMPOSANTES CELLULAIRES REQUISES POUR L'INFECTION

L'investigation de composantes cellulaires importantes pour une infection virale peut se faire selon plusieurs stratégies. Il est possible d'utiliser des techniques d'imagerie, telles que la microscopie confocale ou électronique afin de visualiser le virus à différents moments de l'infection ou en continu grâce aux techniques d'imagerie en temps réel. Il faut cependant être prudent lors de l'interprétation des résultats de telles études. En effet, il est d'abord possible que des changements de conformation lors de l'infection empêchent la détection du virus après un certain point. De plus, et c'est particulièrement le cas pour le PPV, les productions virales peuvent contenir une portion de virus non infectieux qui ne suivra peut-être pas le même chemin dans la cellule comparativement aux virus infectieux. En effet, chez le PPV nous avons observé qu'il y a au moins 5000 virus non infectieux pour chaque virus infectieux. Ce rapport a été déterminé selon la quantité de copies de génome dans une production virale (PCR quantitatif à partir de virus purifié sur coussin de sucrose) par rapport à la quantité de

virus infectieux déterminés lors du titrage. Il est donc évident dans un tel cas que l'observation en imagerie serait grandement influencée par les virus non infectieux plutôt que par les virus infectieux.

La détermination de l'implication d'une composante cellulaire pour l'infection peut être effectuée par l'inhibition de celle-ci avant l'infection par le virus. En utilisant cette stratégie, si le virus n'est pas capable de compléter son cycle de réplication en absence d'une composante cellulaire fonctionnelle, cela indiquera que cette composante est importante pour l'infection. L'inhibition d'une composante cellulaire se fait généralement par l'une des trois stratégies suivantes : l'utilisation d'inhibiteurs chimiques, l'utilisation d'ARN interférents, ou la surexpression d'une version non fonctionnelle de la protéine cible (dominant négatif).

Dans tous les cas, peu importe la méthode choisie, il est important de considérer le fait que l'inhibition d'un mécanisme cellulaire peut être compensée par la cellule via une fonction complémentaire. Ceci pourrait aussi affecter la réplication virale. De plus, les protéines cellulaires ont souvent plusieurs fonctions dans divers mécanismes cellulaires et il peut être difficile de prévoir tous les effets de l'inhibition d'une protéine cellulaire. Aussi, certaines protéines sont essentielles à la survie de la cellule ainsi qu'au bon fonctionnement du cycle cellulaire. L'inhibition de certaines protéines peut alors mener à l'activation de l'apoptose, ou à un arrêt de croissance, empêchant indirectement l'infection virale. Ceci est crucial pour le PPV puisque sa réplication dépend du passage de la cellule en phase S, et il ne peut pas l'induire. Il est donc primordial de s'assurer que le traitement choisi n'affecte pas la croissance et le métabolisme cellulaire.

2.1 Inhibition d'une composante cellulaire à l'aide d'ARN interférent

L'utilisation d'ARN pour inhiber l'expression de certains gènes a été développée suite à l'observation que la transfection d'ARN antisens d'un gène dans des cellules de

plante menait à l'inhibition de la production de cette protéine (Ecker *et al.*, 1986). Plusieurs études chez les plantes ont mené à ce type d'observations surprenantes pour l'époque. En 1998, une élégante étude a été publiée dans Nature, expliquant le phénomène, et a mené au prix Nobel de 2006 pour les auteurs Fire et Mello (Fire *et al.*, 1998).

La technologie exploite un mécanisme cellulaire de régulation d'expression des gènes (Izquierdo, 2005). Un ARN double brin est d'abord reconnu par l'enzyme Dicer, qui le clivera en courte séquence de 21-23 nucléotides. Ensuite, cette courte séquence s'associera avec une protéine Argonaute, qui séparera les deux brins et s'associera avec d'autres cofacteurs, formant le complexe « RISC » (*RNA induced silencing complex*). Ce complexe pourra alors reconnaître l'ARNm cible, complémentaire au brin présent dans le complexe RISC, et procéder au clivage, menant à l'inhibition de la synthèse de la protéine. Si l'appariement est exact entre l'ARNi et l'ARNm cible, il y aura dégradation de l'ARNm. Si l'appariement est imparfait, il y aura inhibition de la traduction, mais pas dégradation de l'ARNm, permettant un contrôle de la traduction qui est réversible (Flynt *et al.*, 2008). Lorsque cette technique est utilisée *in vitro* dans le but d'inhiber une composante cellulaire avant une infection virale, il faut d'abord s'assurer que la séquence de nos ARNi ne cible aucun gène viral. Il existe plusieurs exemples de telles études dans la littérature (Moriyama *et al.*, 2007, Nonnenmacher *et al.*, 2011).

Cette technologie maintenant fortement utilisée en laboratoire est aussi un mécanisme normal cellulaire de régulation de l'expression de gènes. Ce système peut aussi être efficace contre les infections virales (Grassmann *et al.*, 2008). Un exemple est le miRNA appelé miR-32, qui inhibe la réplication par le retrovirus PFV-1 (Lecellier *et al.*, 2005). Synthétisés par la cellule, les miRNA ont d'abord une grande taille avant leur maturation (Bartel, 2004). Ils seront clivés en un ARN d'environ 70 nucléotides avec une structure d'épingle à cheveux (stem loop). Ensuite, ils seront coupés encore par les enzymes mentionnées plus haut pour former de petits ARNdb d'une vingtaine de nucléotides qui pourront être pris en charge par argonaute et former le complexe RISC.

2.1.1 Avantages de l'utilisation d'ARN interférents

Un avantage majeur de cette technologie est la grande spécificité qu'elle procure. En effet, il est possible de s'assurer que la séquence utilisée ne cible pas d'autre gène cellulaire, et qu'elle ne cible pas de gènes viraux. Il faut cependant être prudent avec l'affirmation que notre séquence cible ne vise pas d'autre gène sachant qu'il peut y avoir un certain niveau d'inhibition même si l'appariement de l'ARNi avec l'ARNm n'est pas parfait (X. Lin *et al.*, 2005). Cependant, la plupart des études utilisant cette technologie incluent plusieurs séquences d'ARNi qui ciblent plusieurs portions de l'ARNm choisi. Ainsi, les chances que plusieurs séquences différentes inhibent indépendamment une protéine cellulaire non ciblée résultant en l'inhibition de l'infection virale par un effet secondaire sont alors très minces.

2.1.2 Inconvénients de l'utilisation d'ARN interférents

Un obstacle pouvant être considérable lors d'expériences de transfection d'ARNi est un taux de transfection insuffisant des cellules. En effet, afin d'observer une inhibition de la réplication virale, il est crucial d'obtenir d'excellents pourcentages de cellules transfectées avec notre ARNi. Cette technique demande donc souvent beaucoup d'optimisation avant de pouvoir tester l'effet sur l'infection virale. Par conséquent, dans une étude globale où plusieurs composantes cellulaires doivent être inhibées, la méthode des ARNi peut être laborieuse.

De plus, bien que les compagnies spécialisées en ARNi puissent garantir un produit de grande qualité hautement spécifique du gène cible et préalablement testé afin d'obtenir une bonne inhibition, ces produits sont relativement dispendieux. Encore une fois, lors d'une étude globale incluant plusieurs composantes cellulaires, l'ARNi devient rapidement extrêmement coûteux. L'ARNi serait donc probablement plus approprié pour confirmer quelques composantes cellulaires identifiées par une autre méthode que pour une étude globale de base. Une alternative intéressante est

l'utilisation d'une librairie d'ARNi pour effectuer une étude globale. L'analyse des résultats sera alors le grand défi, afin d'évaluer les résultats significatifs. Il peut aussi y avoir plusieurs faux positifs ou faux négatifs à évaluer (Griffiths *et al.*, 2013, Sivan *et al.*, 2013).

2.2 Inhibition d'une composante cellulaire par la surexpression d'une protéine inactive

À l'opposé de l'inhibition directe de l'expression d'une protéine, il est possible de surexprimer une version défectueuse de la protéine cible (Sieczkarski *et al.*, 2002a). Un mutant dominant négatif est une version mutée et inactive d'une protéine d'intérêt. De plus, lorsqu'il est exprimé dans une cellule, le dominant négatif bloque la fonction de la protéine d'intérêt, même si la cellule exprime aussi la version normale de la protéine. Lorsque les fonctions d'une protéine cellulaire sont bien connues, ainsi que les domaines importants de la protéine pour exercer ces fonctions, des mutants inactifs peuvent être créés. Ensuite, la stratégie est de surexprimer cette version inactive de la protéine dans la cellule. La grande quantité de protéine inactive permettra d'inhiber un mécanisme cellulaire sans devoir altérer l'expression normale de la protéine cellulaire.

2.2.1 Avantages de la surexpression d'un dominant négatif

Cette technologie a pour avantage d'être moins coûteuse que l'ARN interférent. En effet, il est souvent possible d'obtenir le vecteur d'expression de la protéine mutante via un collègue, et de l'amplifier soi-même en laboratoire. Plusieurs études utilisent cette méthode pour confirmer l'utilisation d'une composante cellulaire par un virus. Par exemple, une étude portant sur l'endocytose du virus influenza, utilisant notamment la surexpression d'un mutant dominant négatif de la protéine EPS15, impliquée dans l'endocytose via les vésicules de clathrine, a mis à jour l'utilisation d'un mécanisme d'entrée alternatif pour ce virus (Sieczkarski *et al.*, 2002b). Aussi, plusieurs dominants négatifs des protéines Rab ont permis de déterminer que l'infection par le virus de la

fièvre aphteuse implique l'évasion du virus au niveau des endosomes précoces (Johns *et al.*, 2009).

2.2.2 Inconvénients de la surexpression d'un dominant négatif

Tout comme l'utilisation d'ARNi, l'utilisation d'un dominant négatif dépend aussi de l'obtention d'un excellent taux de transfection. Cette technique est donc plus souvent utilisée pour confirmer l'utilisation d'une composante cellulaire plutôt que pour les études globales de base. De plus, l'expression de protéines non fonctionnelles en grande quantité peut avoir des effets toxiques pour la cellule, menant à l'apoptose ou à l'arrêt du cycle cellulaire. Il faut donc s'assurer de la viabilité des cellules suite à l'expression de la protéine mutante.

2.3 Inhibition d'une composante cellulaire à l'aide d'inhibiteurs chimiques

Plusieurs petites molécules ont été développées afin d'inhiber certains mécanismes cellulaires. Ces inhibiteurs sont largement utilisés afin d'identifier des composantes cellulaires importantes pour des infections virales. Les exemples sont nombreux dans la littérature.

2.3.1 Avantages de l'utilisation des inhibiteurs chimiques

Lorsqu'ils sont disponibles, les inhibiteurs chimiques sont généralement peu coûteux, et facilement accessibles. C'est donc une bonne méthode pour effectuer une étude globale dans laquelle plusieurs composantes cellulaires sont évaluées. De plus, l'ajout de l'inhibiteur au milieu de culture cellulaire permet un traitement uniforme des cellules. C'est donc une alternative intéressante pour les cellules difficiles à transfecter. Méthodologiquement, il est facile d'effectuer des courbes de type dose/réponse afin de vérifier l'effet de l'inhibiteur sur le métabolisme et la survie cellulaire, et de déterminer si

l'inhibition a un effet sur l'infection par le virus étudié. De plus, il est possible de contrôler le temps d'exposition avec les inhibiteurs chimiques. Souvent, leur mécanisme d'action est réversible, et l'on peut alors retrouver des conditions normales pour la cellule. Leur action est aussi habituellement rapide, permettant de traiter les cellules et les infecter rapidement. Ceci permet d'éviter l'établissement de mécanismes de compensation par la cellule et de diminuer les effets toxiques potentiels (Damke *et al.*, 1995). Il est aussi possible de faire une cinétique d'inhibition, en ajoutant l'inhibiteur à différents moments après le début de l'infection, et de déterminer la fenêtre pendant laquelle une composante cellulaire donnée est importante pour le cycle de réplication du virus étudié.

2.3.2 Inconvénients de l'utilisation des inhibiteurs chimiques

Un inconvénient majeur de l'utilisation d'inhibiteurs chimiques est le fait que des effets secondaires inconnus peuvent survenir (Ivanov, 2008). En effet, il est difficile d'affirmer que les inhibiteurs n'ont aucun autre effet sur la cellule que celui recherché. Cet inconvénient peut être contourné en utilisant plus d'un inhibiteur chimique pour chaque composante cellulaire étudiée. Les chances que deux inhibiteurs aient les mêmes effets secondaires sont alors moindres. Ensuite, la plupart des inhibiteurs chimiques peuvent être toxiques pour la cellule en fonction de la dose et du temps d'exposition. Des expériences complémentaires afin de vérifier la toxicité sont donc essentielles et permettent de trouver une dose limite jusqu'à laquelle il n'y a pas d'effet détectable sur le métabolisme cellulaire.

3 LA LOCALISATION NUCLÉAIRE DES PROTÉINES

La délimitation des différents compartiments de la cellule permet la régulation de plusieurs processus cellulaires. La localisation des protéines dans la cellule doit donc être aussi finement régulée. Celle-ci se fait via la reconnaissance de motifs sur la

protéine, interagissant avec des protéines de transport. Par exemple, le signal de localisation au réticulum endoplasmique est le motif KDEL retrouvé en C-terminal (Pelham, 1990). Les protéines devant aller au noyau possèdent des régions riches en acides aminés basiques nommées « signaux de localisation nucléaire ». À l'inverse, la sortie des protéines du noyau se fait via la reconnaissance de régions hydrophobes riches en leucines (signaux d'export nucléaire, NES (Macara, 2001)). Dans tous les cas, un élément clé est l'exposition du domaine à la surface de la protéine afin d'être accessible aux protéines de transport.

3.1 Signaux de localisation nucléaire

Les signaux de localisation nucléaire (NLS) ont été identifiés dans les années 1980 et ils sont caractérisés par la présence d'acides aminés basiques (K, R) concentrés dans une courte région de la protéine (Kalderon *et al.*, 1984). Le NLS de l'antigène grand T de SV40 (PKKKRRV) est encore utilisé aujourd'hui comme témoin positif dans les expériences d'identification de NLS actifs. Certains signaux dits « classiques » sont retrouvés dans plusieurs protéines nucléaires (Macara, 2001). Le motif appelé « Pat4 » est composé simplement de 4 acides aminés basiques consécutifs, ou bien trois acides aminés basiques avec une proline ou une histidine. Le motif « Pat7 » légèrement plus complexe commence par une proline, suivie de 1 à 3 acides aminés non basiques et se termine avec au moins 3 acides aminés basiques dans les 4 résidus suivants (P-X(1-3)-(3-4K/R), par exemple le NLS de la protéine VP8 du virus Herpes bovin de type 1 : PRVRRPR (Zheng *et al.*, 2004)). Ces deux signaux sont dits « monopartite » puisqu'une seule courte région est responsable du transport au noyau. Il existe aussi des signaux « bipartites » qui sont composés de deux séquences basiques séparées d'une région d'espacement habituellement constituée d'une dizaine acides aminés (Lange *et al.*, 2007). La séquence NLS de la nucléoplasmine est un exemple : KRPAATKKAGQAKKKK (Robbins *et al.*, 1991).

Plusieurs signaux non classiques ont été identifiés chez des protéines nucléaires qui ne contiennent pas de signaux classiques. En fait, une étude a montré qu'environ 40 % des protéines nucléaires ne contiennent pas de signaux classiques, suggérant qu'il existe des signaux encore inconnus (Lange *et al.*, 2007). Certains signaux non classiques comportent très peu d'acides aminés basiques, comme le NLS de la protéine NP du virus influenza A : SQGTKRSYEQM (Wang *et al.*, 1997). De plus, un signal bipartite comportant une région d'espacement relativement longue (20 acides aminés) a récemment été identifié pour la protéine Rev du virus de l'immunodéficience bovine (Gomez Corredor *et al.*, 2009).

3.2 Motifs de localisation nucléaire

Le terme « motif » de localisation nucléaire (NLM) a parfois été utilisé pour décrire des signaux de localisation nucléaire non classique qui ne peuvent être identifiés par l'analyse simple de la séquence. Un exemple est le domaine central de 72 acides aminés, nécessaires à la localisation nucléaire de la protéine rpS2 (Antoine *et al.*, 2005). Une autre possibilité est lorsque l'intégrité du motif dépend de la conformation tertiaire ou quaternaire de la protéine. Ainsi, des acides aminés basiques, situés loin les uns des autres dans la séquence primaire de la protéine peuvent se retrouver à proximité lorsque la protéine est repliée, voire associée avec d'autres protéines dans un complexe. Un excellent exemple se retrouve chez les protéines structurales du protoparvovirus MVM (Lombardo *et al.*, 2000). Le NLM identifié dépend du repliement de la protéine, qui crée un feuillet- β qui rapproche les résidus basiques interagissant avec la machinerie de transport nucléaire.

3.3 Mécanismes de transport à l'intérieur du noyau

La voie classique de transport au noyau débute par la reconnaissance du NLS (ou NLM) par une protéine de la famille des Karyophérines (Figure 1.14). Généralement le NLS est reconnu par l'importine- α qui s'associe par la suite avec l'importine- β

(Macara, 2001). Le complexe est alors dirigé vers le pore nucléaire. Le complexe s'associe avec le facteur Ran-GDP et le cofacteur NTF2 et traverse le pore nucléaire. Une fois au nucléoplasme, le facteur Ran-GEF transforme le Ran-GDP en Ran-GTP, déstabilisant le complexe et provoquant la relâche des différentes composantes. La protéine arborant un NLS se retrouve donc au noyau, et les protéines impliquées dans le transport nucléaire sont recyclées au cytoplasme pour un nouveau cycle d'import. Certains mécanismes non classiques ont été décrits dans la littérature, telle qu'une association directe entre le NLS de la protéine à transporter au noyau et l'importine- β . Ce transport est donc indépendant de l'importine- α (Cingolani *et al.*, 2002). Par exemple, les protéines Rev et Tat du virus VIH-1 interagissent directement avec l'importine- β (Truant *et al.*, 1999).

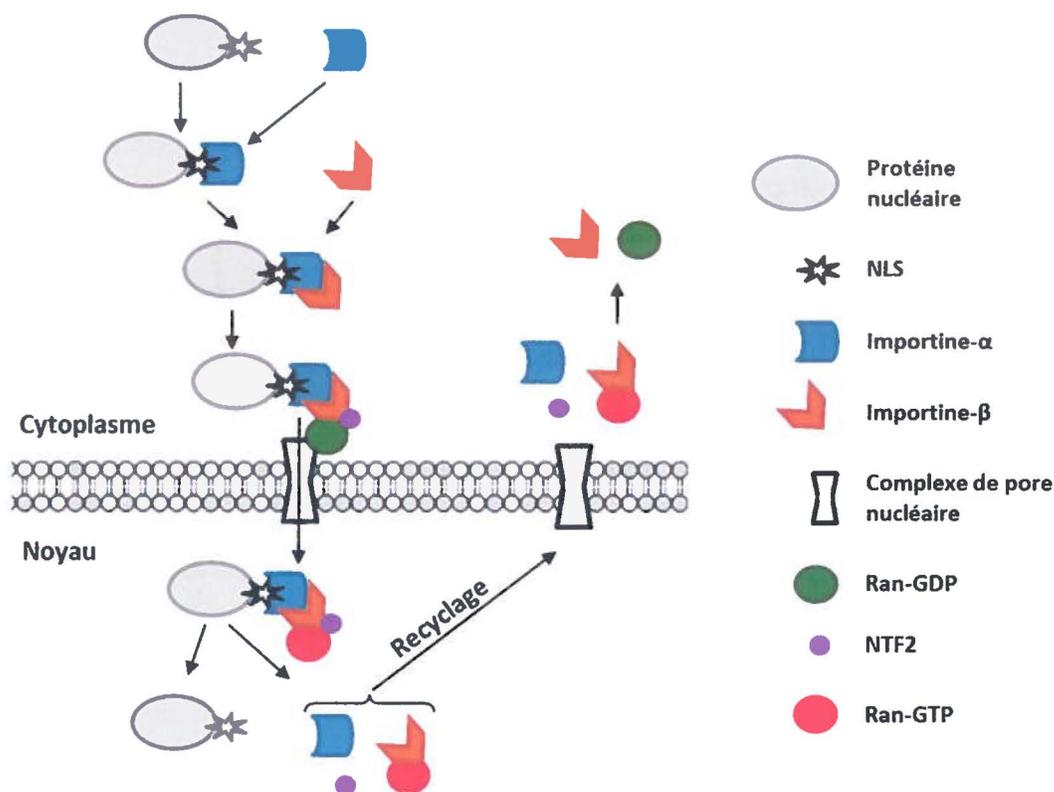


Figure 1.14. Mécanismes d'import nucléaire

L'import nucléaire classique débute par l'association entre le signal de localisation nucléaire (NLS) d'une protéine et l'importine- α . Il y a ensuite dimérisation entre l'importine- α et l'importine- β , et transport vers le complexe de pore nucléaire (NPC). Le complexe protéine nucléaire – importines s'associe avec le facteur Ran-GDP et le cofacteur NTF2, et transloque à travers le pore nucléaire. Une fois au noyau la transformation du Ran-GDP en Ran-GTP provoque la dissociation du complexe et la relâche de la protéine transportée au noyau. Les facteurs de transport seront recyclés au cytoplasme pour un nouveau cycle d'import et le Ran-GTP converti de nouveau en Ran-GDP.

3.4 Signaux et motifs de localisation nucléaire chez les parvovirus

Les protéines de la capsid des parvovirus doivent être transportées au noyau lors de deux étapes distinctes de l'infection. D'abord, lors des étapes précoces, la capsid doit permettre la livraison du génome au noyau. Ayant un diamètre d'environ 25 nm, la capsid des parvovirus peut théoriquement entrer complète au noyau par le complexe de pore nucléaire dont la limite maximale de taille a été estimée à 25-30 nm (Stewart, 2007). À tout le moins, la capsid doit se rendre au pore nucléaire afin d'injecter l'ADN au noyau. Deuxièmement, lors des étapes tardives, les protéines de la capsid synthétisées au cytoplasme devront retourner au noyau afin de former les particules virales complètes. Lors d'une infection, ou bien lors d'expériences étudiant la localisation et l'assemblage des protéines structurales, la capsid a toujours été observée seulement au noyau. Ceci suggère fortement que le transport au noyau est effectué avant l'assemblage en capsid. Il est possible que certains facteurs, tels des chaperonnes présentes seulement au noyau, soient nécessaires pour l'assemblage. Plusieurs éléments, nécessaires au transport nucléaire des protéines structurales, ont été identifiés chez les parvovirus.

Le protoparvovirus MVM est un excellent exemple et il contient deux types de séquences permettant la localisation au noyau. Il contient un NLS classique (Figure 1.15 A) dans la région N-terminale de la protéine VP1 (Lombardo *et al.*, 2002) et un motif non classique de type NLM (Figure 1.15 B-C) dans la région C-terminale commune aux deux protéines structurales (Lombardo *et al.*, 2000). Structuralement, le NLM est situé dans un feuillet- β , et l'activité de transport nucléaire dépend de la bonne conformation obtenue lors du repliement correct de la protéine. En effet, cette séquence ne peut transporter une autre protéine, lorsque fusionnée avec le NLM de MVM. De plus, le repliement en feuillet- β permet le rapprochement des acides aminés basiques du motif puisque ceux-ci se retrouvent alors tous du même côté, celui exposé au solvant dans la configuration du trimère.

La présence de la protéine VP1 permet aussi le transport de mutants de VP2 qui sont incapables de se rendre seuls au noyau (Lombardo *et al.*, 2000, Lombardo *et al.*, 2002). Ceci suggère fortement que les protéines VP1 et VP2 interagissent ensemble dans le cytoplasme avant le transport au noyau. Il est intéressant de noter que ce NLM est situé sur la face interne de la capsidie après l'assemblage. Ce NLM serait donc utilisé pour transporter les trimères au noyau, mais ne pourrait pas être utilisé pour le transport de la capsidie en début d'infection. En effet, des clones infectieux dont le NLM a été muté ne forment aucune capsidie, puisque les trimères contenant seulement VP2 demeurent au cytoplasme, et ils sont essentiels à l'assemblage (Lombardo *et al.*, 2002). Un clone infectieux contenant un NLM normal et portant une mutation qui inactive le NLS quant à lui permet la formation de virions complets. Ces virions sont par la suite capables de se lier à une cellule et entrer, mais l'infection par de tels virus mutants ne produit aucun ADN, suggérant que le génome viral ne peut être transporté au noyau au début de l'infection. Donc, les protéines de la capsidie du MVM contiennent deux types de signaux responsables du transport au noyau. Ces signaux sont temporellement accessibles à la machinerie de transport nucléaire, permettant un usage distinct, soit lors des étapes précoces ou tardives de l'infection.

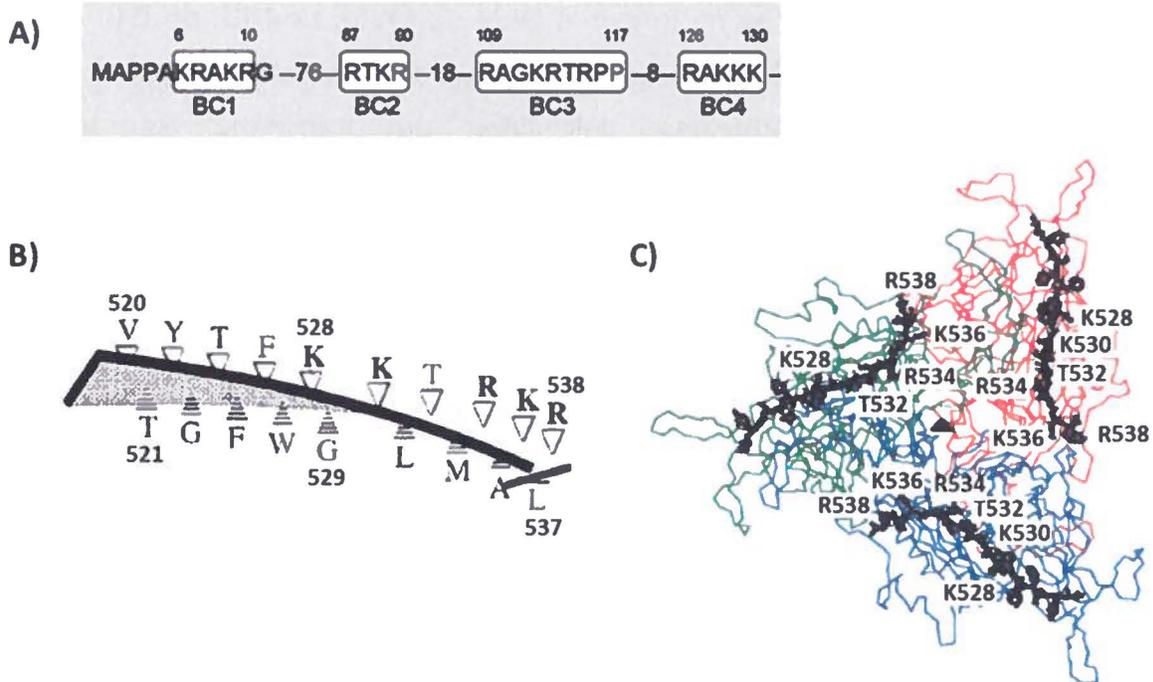


Figure 1.15. Signal et motif de localisation nucléaire du protoparvovirus MVM
 Localisation nucléaire des protéines structurales de MVM. A) Régions basiques de la portion unique de VP1. BC1 est le seul NLS actif de la protéine (tiré de (Lombardo et al., 2002)). B) NLM des protéines structurales de MVM. Les résidus basiques sont rapprochés dans le feuillet- β , et la structure est importante pour l'activité d'import nucléaire. C) Localisation du NLM dans le trimère (face interne dans la capside). (B-C tirés de (Lombardo et al., 2000)).

Le CPV contient une séquence riche en acides aminés basiques situés dans la région N-terminale de VP1 (résidus 4-13), capable de transporter la protéine BSA (Albumine de serum bovin) au noyau (Vihinen-Ranta *et al.*, 1997) et importante pour la localisation nucléaire de la capside et pour la réplication virale (M. Vihinen-Ranta *et al.*, 2002). De plus, la région correspondant au NLM de MVM est aussi conservée chez le CPV (voir section 4.2 Figure 1.16).

L'identification de la région responsable du transport nucléaire de la protéine VP2 de l'érythroparvovirus B19 a aussi révélé un signal d'import non classique (Pillet *et al.*, 2003). La protéine VP2 est très peu conservée entre les *Protoparvovirus* tels que MVM et les *Érythroparvovirus*. En effet, le NLM identifié chez MVM n'est pas présent chez le B19. Des études de délétion et de mutations ont montré que le NLS de B19 est

situé juste après le feuillet- β où se trouve le NLM de MVM. Le NLS de B19 est donc plutôt situé dans une structure en boucle entre deux feuillets- β , augmentant son accessibilité pour les protéines cellulaires de transport. Sa séquence (KLGPRKATGRW) est aussi très peu conservée avec la protéine VP2 du PPV (TFTAKMRSSNMW).

4 PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

Tel que mentionné dans la section 1.1, le PPV est un pathogène important chez le porc à travers le monde. Les problèmes de reproduction qu'il cause peuvent engendrer d'importantes pertes économiques. Heureusement, les vaccins disponibles permettent d'éviter les problèmes de reproduction. Cependant, le protocole de vaccination est lourd puisque les femelles doivent être vaccinées avant chaque insémination. De plus, ce vaccin n'empêche pas la réplication du virus chez la femelle. Le virus est donc en constante circulation dans les fermes, posant un risque de mutation et d'évolution vers un virus dont le vaccin n'empêcherait plus les problèmes de reproduction. Il est donc impératif de suivre l'apparition des nouvelles souches sur le terrain et d'évaluer l'impact des différentes mutations observées.

Parallèlement, nos connaissances sur la biologie du PPV sont limitées, particulièrement en ce qui concerne les interactions virus-cellule. Ce projet de doctorat a donc pour but principal de mieux comprendre les interactions entre le virus et la cellule hôte favorisant la réplication virale. Ultimement, l'identification de ces interactions pourrait servir de cible thérapeutique afin de limiter la réplication virale chez le porc. Les travaux effectués lors de ce projet ont été divisés en trois objectifs de recherche spécifiques.

4.1 Identification de composantes cellulaires importantes pour l'infection par le parvovirus porcin

Les premières interactions entre le virus et la cellule sont critiques puisqu'elles permettent au virus de livrer son génome dans le compartiment approprié. Les étapes précoces de l'infection pour le PPV mènent à la livraison du génome au noyau de la cellule. Selon les avantages et inconvénients expliqués dans la section 2, nous avons choisi la stratégie d'inhibition des composantes cellulaires par des inhibiteurs chimiques. Ce choix a d'abord été motivé par leur disponibilité et leur faible coût, nous permettant de tester plusieurs composantes en parallèle. De plus, les cellules utilisées lors de ce projet, fibroblastes de testicules de porc, sont excellentes pour amplifier le virus, mais sont difficilement transfectables, limitant l'utilisation d'ARNi ou de mutants dominants négatifs. Cette méthode est aussi plus flexible et permet d'effectuer des cinétiques d'inhibition, en ajoutant l'inhibiteur à différents moments après l'infection. Nous avons donc utilisé une gamme d'inhibiteurs afin d'identifier des composantes cellulaires impliquées dans l'attachement, l'entrée, le transport du PPV ainsi que l'implication potentielle du protéasome lors de l'infection. Notre hypothèse est que le PPV utilise les mêmes composantes cellulaires que ses proches parents MVM et CPV (endocytose dépendante de la clathrine, voie endosomale, acidification, microtubules et protéasome). Certaines composantes pourraient aussi être uniques au PPV.

4.2 Identification des signaux de localisation nucléaire des protéines de la capsid

Tel que mentionné dans la section 3.4, le transport au noyau des protéines de la capsid est critique lors de deux étapes de l'infection par le PPV. D'abord, lors de l'infection précoce, la capsid complète doit cibler le noyau afin d'y livrer son génome. Puis, lors de l'infection tardive, les protéines de la capsid nouvellement synthétisées doivent se rendre au noyau avant d'être assemblées en capsid. Nous avons donc comme second objectif de recherche d'identifier les signaux permettant la localisation nucléaire des protéines de la capsid.

Nous avons comparé les protéines de la capside du PPV avec le proche parent MVM pour lequel les séquences importantes pour la localisation nucléaire des protéines de la capside ont été identifiées. Le PPV, tout comme le MVM contient plusieurs régions basiques pouvant être de potentiels NLS dans la région N-terminale unique de VP1. La protéine VP2 ne contient pas de régions avec plus de deux acides aminés basiques à proximité (Annexe I, Figure 3). Le transport de VP2 au noyau semble donc dépendre d'un signal non conventionnel. Le MVM contient un motif de localisation nucléaire (NLM) dans la partie C-terminale commune aux deux protéines structurales (Lombardo *et al.*, 2000). Cette région est très bien conservée chez le protoparvovirus CPV (GenBank A26575.1) et comprend cinq acides aminés basiques, responsables du transport au noyau de la protéine VP2. Cependant, cette région est très peu conservée chez le PPV (Figure 1.16 A). Le PPV contient seulement trois acides aminés basiques, dont un est assez éloigné des deux autres. De plus, un mutant de la protéine VP2 de MVM contenant trois acides aminés basiques dans la même conformation que le PPV est pratiquement complètement retenu au cytoplasme (Figure 1.16 B). Ceci suggère que la séquence responsable du transport au noyau de la protéine VP2 du PPV est différente de celle retrouvée chez MVM. Notre hypothèse pour cet objectif est donc que le PPV possède au moins un NLS classique actif dans la région unique de VP1 et un motif structural non conventionnel dans la région commune entre VP1 et VP2.

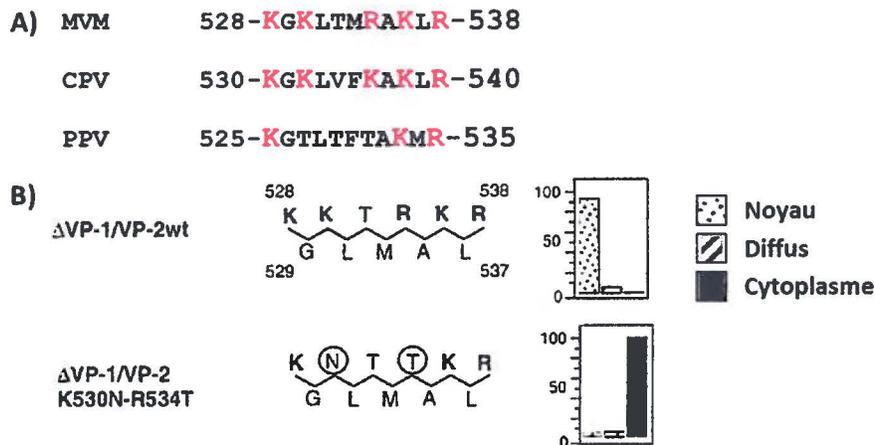


Figure 1.16. Comparaison des séquences du NLM de MVM avec les protoparvovirus CPV et PPV
Motif de localisation nucléaire (NLM). A) Alignement du NLM de MVM et comparaison avec les séquences du CPV et du PPV. B) La mutation du NLM de MVM menant à une protéine équivalente au PPV empêche le transport au noyau de VP2 (adapté de (Lombardo *et al.*, 2000)).

4.3 Détermination de l'importance de l'expression rapide de la protéine non structurale NS1

La protéine multifonctionnelle NS1 est absolument essentielle au bon déroulement de l'infection. Une fois le génome livré au noyau, le virus dépend entièrement des facteurs cellulaires afin de produire cette protéine. Par la suite, elle peut favoriser l'infection à plusieurs niveaux comme décrits dans les sections 1.5.4 ; 1.6.2 et 1.6.3. Nous possédons au laboratoire deux souches de PPV (NADL-2 et Kresse) qui, malgré leur identité de 97 % (>99 % en dehors de la répétition de 127 nt), se répliquent à des taux différents en culture cellulaire. En effet, la souche NADL-2 produit environ 10 fois plus de virus que la souche Kresse (Fernandes *et al.*, 2011). Nous disposons également d'une lignée cellulaire bovine (cellules G11) dans laquelle la réplication de NADL-2 est limitée par rapport aux cellules porcines, et où la souche Kresse se réplique à peine plus que le niveau de détection de nos essais. Avec ces outils, nous avons deux sous objectifs, le premier était de déterminer si l'expression de NS1 est différente entre les deux souches de PPV dans la lignée cellulaire porcine. Le second était de déterminer si l'expression de NS1 est un facteur limitant de la réplication virale dans les cellules semi-permissives bovines et donc si NS1 est impliquée dans le tropisme. Puisque NS1 est une protéine essentielle à plusieurs étapes du cycle de réplication viral, notre hypothèse est que l'expression de la protéine NS1 est différente selon la souche virale et limitée dans les cellules bovines.

CHAPITRE 2 : PREMIER ARTICLE

Multiple Pathways Involved in Porcine Parvovirus Cellular Entry and Trafficking toward the Nucleus.

Journal of Virology. Aug. 2010, p. 7782–7792

Maude Boisvert, Sandra Fernandes, and Peter Tijssen

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

Résumé de la publication

Titre : Plusieurs mécanismes sont impliqués dans l'entrée et le transport du parvovirus porcin vers le noyau

Le parvovirus porcin (PPV) est un pathogène causant d'importants problèmes de reproduction chez les porcs. Les mécanismes impliqués dans les étapes précoces de l'infection menant à la livraison du génome viral au noyau sont peu connus. Dans ce travail, nous avons utilisé une gamme d'inhibiteurs chimiques afin d'identifier les composantes cellulaires nécessaires à l'établissement de l'infection par le PPV. Nos résultats ont montré qu'après l'attachement sur les acides sialiques présents sur les glycoprotéines de surface cellulaire, le virus a utilisé les mécanismes d'endocytose dépendante de la clathrine ainsi que la macropinocytose pour entrer dans la cellule. Les particules virales obtenues après une infection virale sont présentes soit sous la forme de particules isolées ou sous la forme d'agrégats, et peuvent être séparées par centrifugation à basse vitesse. Les particules isolées et purifiées sont entrées préférentiellement dans la cellule par endocytose dépendante de la clathrine, tandis que les agrégats ont clairement favorisé la macropinocytose. On a aussi montré que l'acidification de la voie endosomale et le passage aux endosomes tardifs étaient essentiels pour l'infection. De plus, le réseau de microtubules était important pendant

les 10 premières heures d'infection, tandis que les filaments d'actines étaient requis pendant tout le cycle d'infection. On a aussi montré que l'activité du protéasome est essentielle à l'infection et les protéines de la capsidie étaient ubiquitinylées rapidement durant l'infection. Mis ensemble, ces résultats ont révélé des composantes cellulaires importantes pour les étapes précoces de l'infection par le PPV, incluant l'utilisation d'un mécanisme d'entrée alternatif, unique chez les membres de la famille *Parvoviridae*.

Contribution des auteurs

Le projet a été élaboré principalement par Maude Boisvert et Peter Tijssen, et les manipulations ont été majoritairement effectuées par Maude Boisvert. Sandra Fernandes a participé à la récolte d'échantillons lors des cinétiques d'infection. Le manuscrit a été rédigé par Maude Boisvert et révisé par les trois auteurs.

Abstract

Porcine parvovirus (PPV) is a major cause of reproduction failure in swine. The mechanisms implicated in the first steps of infection that lead to the delivery of the PPV genome to the nucleus are poorly understood. In the present work, a panel of chemical inhibitors was used to dissect cellular mechanisms involved in establishing a PPV infection. Results demonstrated that following binding to sialic acids on cell surface glycoproteins, the virus used both clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis pathways to gain access into cells. Virus obtained from infected cells was present either as isolated particles or as aggregates and these two forms could be separated by low-speed centrifugation. Isolated and purified particles strongly preferred entry by clathrin-mediated endocytosis whereas aggregates clearly favored macropinocytosis. Subsequent endosomal acidification and traffic to the late endosomes were also shown to be essential for the infection. The microtubule network was found to be important during the first 10 hours of infection, whereas an intact actin network was required for almost the complete viral cycle. Proteasome processing was found to be essential and capsid proteins were ubiquitinated relatively early during infection. Taken together, these results provided new insights on the first steps of PPV infection, including the use of alternative entry pathways, unique among this viral family.

Introduction

Porcine parvovirus (PPV) is a major causative agent of reproductive failure in swine, a syndrome which includes infertility, early embryonic death, mummified fetuses and stillbirth (Szelei, 2006). PPV belongs to the *Parvovirus* genus in the Parvovirinae subfamily of the Parvoviridae family (Tattersall, 2006). This family is characterized by small non-enveloped, icosahedral viruses of about 26 nm in diameter. The genome of these viruses is a linear, negative single-stranded DNA of about 5 kb featuring distinct hairpin termini (Bergeron *et al.*, 1996, Bergeron *et al.*, 1993). Transcript mapping revealed promoters for both the nonstructural and structural protein gene cassettes, and intricate splicing mechanisms generate several proteins from each promoter (Bergeron

et al., 1993). The 3D-structure of this virus has been determined by X-ray crystallography (Simpson *et al.*, 2002). The compact structure of the capsid confers great stability to different conditions including wide ranges of pH and high temperatures (Cotmore *et al.*, 2007). Infectious particles contain a total of 60 VP1/VP2 proteins arranged in a T=1 capsid (Simpson *et al.*, 2002). The VP1 protein consists of the VP2 sequence with an N-terminal extension that is normally folded within the particle (Simpson *et al.*, 2002). During entry, about 22-25 amino acids of the N-terminus of the majority of the VP2 proteins are cleaved off, forming VP3 (Cotmore *et al.*, 2007), and allowing the N-terminus of VP1 to be externalized during passage in the endosomes (Canaan *et al.*, 2004). The unique N-terminus part of the VP1 protein contains a viral phospholipase A2 motif (PLA2). This protein is not crucial for assembly of progeny virions but is essential for infectivity of the virions (Tullis *et al.*, 1993). The enzyme's activity provides the virus with the means to breach the endosomal barrier (Farr *et al.*, 2005, Zadori *et al.*, 2001).

Parvoviruses deploy a plethora of strategies to deliver the genome to their site of replication, the nucleus (Chiorini, 2006, Cotmore *et al.*, 2007, M. Vihinen-Ranta, Parrish, C. R., 2006). The sturdy, extracellular viral particles undergo multistep conformational changes that are locally and temporally regulated after interaction with cell surface receptors and by other specific intracellular signals (Cotmore *et al.*, 2007, Weitzman, 2006). Particle-to-infectivity ratios are at least 250:1 (Zadori *et al.*, 2001). Therefore, productive and non-productive pathways are difficult to distinguish making it challenging to understand the specific trafficking of parvoviruses. Nevertheless, several discrete steps have been recognized (Tattersall *et al.*, 2006): (i) initial interaction with cell surface receptors (Govindasamy *et al.*, 2003, Harbison *et al.*, 2009, Harding *et al.*, 1992, Hueffer *et al.*, 2003a, Hueffer *et al.*, 2004, Hueffer *et al.*, 2003b, Nam *et al.*, 2006); (ii) trafficking through the endosomal pathway (Mani *et al.*, 2006, Parker *et al.*, 2000, Suikkanen *et al.*, 2002, M. Vihinen-Ranta *et al.*, 1998, Zadori *et al.*, 2001); (iii) escape from the endosomes through the newly exposed viral PLA2 (Farr *et al.*, 2005, Pakkanen *et al.*, 2009, Parker *et al.*, 2000, Suikkanen *et al.*, 2002); and (iv) cytoskeleton-driven transport to the nucleus (Nuesch *et al.*, 2005, Suikkanen *et al.*, 2003a, M. Vihinen-Ranta

et al., 1998). Although most parvoviruses use equivalent routes for gaining access to the cell, there are considerable differences among species. The mechanisms involved in these early steps are poorly understood for PPV.

Some viruses use complicated multistep attachment and binding to specific receptors, while others bind more common structures like sialic acids (Carroll *et al.*, 1981). These structures are located at the end of glycans, are fairly accessible for protein binding such as virus docking, and their density may increase avidity (Barton *et al.*, 2001). Several parvoviruses bind specifically to the transferrin receptor, including feline parvovirus (FPV) (Parker *et al.*, 2001) and canine parvovirus (CPV) (Parker *et al.*, 2000). Minute virus of mice (MVM) and bovine parvovirus (BPV) bind the cells via sialic acids (Johnson *et al.*, 2004, Lopez-Bueno *et al.*, 2006) whereas the human parvovirus B19 binds to the blood group P antigen and integrin $\alpha 5\beta 1$ on erythroid progenitor cells (Brown *et al.*, 1993, Weigel-Kelley *et al.*, 2003). In the case of PPV, the specific receptor remains unknown, but the transferrin receptor is not essential since the virus is able to enter quail cells lacking this receptor (unpublished data).

Binding to specific receptors can trigger entry of the virus via the ubiquitous and constitutive clathrin-coated pit endocytosis (Rappoport, 2008). This well-studied pathway requires specific receptor attachment to promote cell membrane invagination and assembly of the clathrin cage (Perrais *et al.*, 2005). At the early endosome stage, a sorting step determines if the vesicle is recycled back to the cell membrane or proceeds further in the endosomal pathway toward the late endosomes and lysosomes (Bishop, 2003). Another well-known endocytosis mechanism takes place in cholesterol rich lipid rafts (Lajoie *et al.*, 2007). Caveolae endocytosis is not constitutive and needs to be triggered. This entry mode was shown to be responsible for SV-40 infection (Norkin, 1999) and, among the parvoviruses, only Adeno associated virus-5 (AAV5) is known to use it (Bantel-Schaal *et al.*, 2009). A third mechanism for virus entry into a cell is macropinocytosis (Swanson *et al.*, 1995). Although this actin-driven endocytosis displays a low rate in several cell types, it can be upregulated after interaction of a virus

with the cell (Falcone *et al.*, 2006). In contrast to the two previously described endocytosis pathways, it does not require specific receptor binding (Jones, 2007). After their formation, the macropinosome vesicles are acidified as in the endosomal pathway. Other less common “non clathrin-non caveolae mechanisms” endocytosis mechanisms are now also emerging (Mayor *et al.*, 2007, Muro *et al.*, 2003, Sandvig *et al.*, 2008).

Most entry pathways described above lead to endosomal or endosome-like pathways, characterized by acidification and exposure to several proteases meant to destroy the vesicle content. However, several viruses take advantage of these changes in the environment to trigger conformational changes in their capsid, or fusion with the endosome’s membrane (Suikkanen *et al.*, 2003a, Suikkanen *et al.*, 2003b). For parvoviruses, externalization of the unique part of the VP1 capsid protein is essential to the infection (Farr *et al.*, 2005, Pakkanen *et al.*, 2009, Parker *et al.*, 2000, Suikkanen *et al.*, 2002) since it exposes the catalytically active viral PLA2 domain essential for establishing a productive infection (Zadori *et al.*, 2001). The transport of endosomal vesicles is mediated by microtubules (MTs) towards the microtubule organisation center (MOTC), located in the perinuclear region (Greber *et al.*, 2006, M. Vihinen-Ranta *et al.*, 2000). Accordingly, trafficking to the late endosomes/lysosomes is not only beneficial for conformational changes but also for transport to the nucleus. Once escaped to the cytoplasm, the capsid itself could interact with the MTs motors or with the actin network components (Radtke *et al.*, 2006, Ros *et al.*, 2002, Vendeville *et al.*, 2009).

Important cellular processes involved in different virus infections may include the proteasome (Delboy *et al.*, 2008, Ros *et al.*, 2004, Teale *et al.*, 2009, Yu *et al.*, 2005). This component degrades targeted proteins into small peptides that are then processed by cellular proteases leading to yield amino acids (Kornitzer *et al.*, 2000). In the case of parvoviruses, the role of the proteasome can be beneficial or detrimental to the infection cycle, depending on the virus. AAV virions are degraded by the proteasome, aborting the infection (Douar *et al.*, 2001). On the other hand, proteasome processing is required

for MVM productive infection, although the mechanism remains unclear (Ros *et al.*, 2002, Ros *et al.*, 2004).

In this study, a panel of chemical inhibitors was used to investigate the cellular entry and transport of PPV. To minimize the side effects of these pharmacological inhibitors, two drugs, known to be the most selective, were used to target cellular components at concentrations that least compromised their specificity while remaining effective. The infection could be inhibited by removal of sialic acid moieties from cell surface glycoproteins. Virus entry could also be partially inhibited by both clathrin and macropinocytosis inhibitors, while isolated/purified or aggregated PPV particles were shown to preferentially use alternative entry modes. After gaining entry into the cells, inhibition of endosomal acidification, traffic to the late endosomes, or destruction of either microtubules or actin networks greatly reduced the infection. Finally, capsid proteins were ubiquitinated early during infection as shown by co-immunoprecipitation and inhibition of the proteolytic activities of the proteasome almost completely abolished the infection.

Material and methods

Chemicals and antibodies

Neuraminidase (Neura), amiloride (Ami), chlorpromazine (Chl), nystatin (Ny), methyl- β -cyclodextrin (MBC) and MG-132 were purchased from Sigma. Cytochalasin D (CyD), Nocodazole (Noc), Paclitaxel (Pac) Latrunculin A (LatA) and Lactacystin (Lac) were purchased from Calbiochem. Bafilomycin A1 (Baf) was purchased from LC Labs and Brefeldin A (BFA) from BioLegend. Protease inhibitors (Complete, EDTA-free tablets) and NBT-BCIP colorimetric substrate were purchased from Roche Applied Science. The MTT viability assay kit was purchased from Sigma. PPV antibodies included monoclonal mouse 3C9 antibody (ATCC CRL-1745), specific to PPV capsid and polyclonal rabbit anti-VP2 antibody obtained via rabbit immunization (Canaan *et al.*, 2004). Mouse monoclonal anti-ubiquitin (P4D1) antibody was purchased from

SantaCruz. Secondary antibodies included goat anti-mouse and anti-rabbit conjugated to alkaline phosphatase (AP) (Bio-Rad) and goat anti-mouse and anti-rabbit coupled with Alexa Fluor (488) (Invitrogen).

Cells and viruses

Porcine testis (PT) fibroblast cells, derived from the ST cells (ATCC CRL-1746)(Bergeron *et al.*, 1993), were grown at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium (GIBCO-Invitrogen) containing D-glucose and L-glutamine, and supplemented with 7% heat-inactivated foetal bovine serum (Wisent) and antibiotics (penicillin/streptomycin, Invitrogen). The NADL-2 vaccine strain of PPV was used for infection (ATCC VR-742) and viral stocks were obtained by propagation in cell culture. PPV was collected in the supernatant after cell lysis and used directly in the experiments unless otherwise indicated. Viral stocks were titrated by immunofluorescence (IF) in 96-wells plates, at 20 h post-infection (p.i.) with monoclonal mouse 3C9 capsid-specific antibody, together with anti-mouse Alexa 488 as secondary antibody. Fluorescent nuclei were scored and virus titers were expressed in Fluorescent foci Forming Units/ml (FFU/ml).

From the crude preparation, aggregates and isolated particles of PPV were separated by centrifugation at 15 000×g for 10 min. Isolated particles were obtained directly in the supernatant and aggregates were found in the pellet, reconstituted with the same volume of cell culture medium. Electron micrographs showed that there were no or very few isolated particles in the aggregate preparations and very few aggregates in the isolated stock (data not shown).

PPV purification

Purified virus was obtained from PPV-infected PT cells supernatants. Crude supernatants were first cleared by centrifugation at 10 000×g for 45 min at 4°C. PPV was precipitated from supernatant using 7.5% PEG 8000 / 1.5 M NaCl (final

concentrations), 16 h at 4°C, and collected by centrifugation at 15 000×g for 45 min at 4°C. The pellet was dissolved in 5 ml of 10 mM Tris-HCl pH 7.5, and dialyzed overnight against the same buffer. Virus was also extracted from the cell debris fraction from the first centrifugation. The pellet was resuspended in 10 ml of 10 mM Tris-HCl pH 7.5 and treated with 2 ml trypsin 1X and 50U DNase I for 4 h at 37°C. Then, PPV was extracted using one volume chloroform and centrifugation at 3 500×g for 10 min. These two PPV preparations were then purified using ultracentrifugation over sucrose cushions (2 ml sucrose 50% + 2 ml sucrose 20%) at 200 000×g for 2 h. Fractions were collected and submitted to 10% SDS-PAGE and Coomassie staining to detect PPV proteins. Positive fractions were pooled and dialysed against 100 mM sodium phosphate buffer pH 7.0. A second round of purification by ultracentrifugation was performed as described. Final purified PPV was titrated as described before.

Drug treatments and PPV infection

For IF experiments, cells were plated on glass coverslips at 5×10^4 cells per well in 24-well plates. For qPCR experiments, cells were plated directly in the plates, as described for IF experiments. For each inhibitor, dose-response curves were obtained by treating cells with increasing concentrations of each inhibitor and toxic doses were determined by the MTT assay according to the manufacturer's instructions (Sigma). The optimal dose of each inhibitor was determined to be the concentration displaying the best inhibition of infection without detectable toxic effects on the cells. One day after plating, cells were treated with the optimal dose of inhibitor for the times indicated below and infected with NADL-2 at an MOI of 2 for IF, and 0.1 for qPCR. Cells were either fixed (IF) or harvested (qPCR) 20 h p.i. As a control, the impact of the inhibitors on cell growth was also evaluated by qPCR with specific c-myc primers as described below, after treatment of the cells with optimal doses of inhibitors for 20 h.

For neuraminidase treatments, cells were treated for 1 h with increasing concentrations of neuraminidase, washed 3 times with 1X PBS (2.7 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , 144.3 mM NaCl, 8.1 mM Na_2HPO_4) to remove cleaved sialic acids. Cells were

then infected, in the presence of neuraminidase, for 2 h and washed again. Infection was allowed to proceed for a total of 20 h in the presence of a low dose of neuraminidase (2 mU/ml).

For entry experiments, cells were treated for 1 h with either inhibitor, infected with NADL-2 in presence of the inhibitors and washed 2 h p.i. to remove all viruses in the supernatant. Cells were then treated with neuraminidase (2 mU/ml) to remove all bound virus that failed to enter the cells. Binding experiments were also performed with entry inhibitors. Cells were treated for 1 h at 37°C, and subsequently chilled to 4°C to completely inhibit PPV entry in the cells. PPV was then added, and incubated at 4°C for 2 h. Cells were gently washed with cold 1X PBS to remove unbound virus and transferred to 37°C for 2 h to allow entry. Cells were washed again and incubated for a total of 20 h at 37°C.

For cytoplasmic trafficking experiments and proteasome processing, cells were treated 1 h prior to infection, and the inhibitors remained present for the duration of the infection. However, since the inhibitor for the actin network (latrunculin A) can block cytoplasmic trafficking and macropinocytosis, it was added 2 h p.i. and kept for the rest of the infection. Pulse experiments were also performed by adding the inhibitors (Noc, LatA, Baf, BFA and MG-132) at different times throughout the infection.

Immunofluorescence

At designated times, or at 20 h p.i., cells were fixed with 3% formaldehyde in IF buffer (1X PBS, 0.02% sodium azide and 0.1% BSA) for 30 min and washed 3 times with 1X PBS. Cells were permeabilized with 3% Triton X-100 in IF buffer for 30 min and washed 3 times with 1X PBS. PPV was detected with monoclonal mouse 3C9 anti-capsid primary antibody for 1 h (diluted 1:50 in IF buffer). Cells were washed with 1X PBS and incubated with goat anti-mouse secondary antibody, conjugated with Alexa 488, for 1 h (1:2000 in IF buffer). Finally, DNA was stained with Hoechst 33258 (2

µg/ml) for 30 min and coverslips were fixed on slides that were kept at 4°C in the dark until reading. Percentages of infected cells were obtained by scoring the virus positive nuclei to total nuclei. For each experiment, the infection level of untreated cells was arbitrarily set at 100% infection. For each inhibitor, at least 300 cells were scored for each coverslip (samples in triplicate), in at least three independent experiments.

Quantative PCR (qPCR)

At 20 h p.i., cells were washed with 1X PBS. Cells were scraped from the plate in 150 µl of STE buffer (1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) and harvested in tubes. Then, 500 µl of heated lysis buffer was added (0.75 % SDS, 1.25 M NaCl, 20 mM Tris pH 7.5, 10 mM EDTA, 100 µg/ml proteinase K, 100 µg/ml RNase). Tubes were incubated at 37°C for 4 h, and chilled at -20°C for at least 30 min. The supernatants were collected after a 20 min centrifugation at 20 000×g at 4 °C. DNA was then extracted with 500 µl Miniprep Express™ Matrix (MP Biomedicals) according to manufacturer's instructions. DNA was eluted with 100 µl of PCR water. Each sample was diluted 1:10 for PCR purposes and qPCR was performed as described before (Wilhelm *et al.*, 2006) to quantify PPV genome copies number. Primers specific to the VP2 region (forward primer: 5'- ggg gga ggg ctt ggt tag aat cac -3'; reverse primer: 5'- acc aca ctc ccc atg cgt tag c -3', based on GenBank NC_001718.1) were used. Cellular DNA content was used to normalize the results with qPCR targeting c-myc gene (forward primer: 5'- ctc cct gag act ctg cca tc -3'; reverse primer: 5'- gct gcc tct ttt cca cag aa -3', based on GenBank X97040.1). Cycling conditions were the following: 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 95°C, 15 sec; 60 °C, 60 sec. Fluorescence was acquired after each cycle. Amplifications were carried out in a RotorGene 3000 system (Corbett), with 2xSybr green master-mix (ABSciences). Standard curves were performed using plasmid containing PPV or c-myc DNA. Myc DNA fragment was cloned in pSmarHC AmpR vector (Lucigen, GenBank AF399742) by the addition of HindIII and BamHI restriction sites (forward primer: 5'- CGTAAGCTTTCGGACTCTCTGCTCTCCTC-3', reverse primer: 5'- CTGTCTAGAGCTGCCTCTTTTCCACAGAA-3'). PPV curves were done using the

infectious clone in pSmarHC AmpR vector. Melting curve analysis was performed from 60°C to 95°C, rising of 1°C at each step of 30 sec for specific product amplification control.

Co-immunoprecipitation and western blot

Cells were plated in 6-well plates (3×10^5 cells/well) one day before experiment. Cells were treated or mock-treated with MG-132 at 5 μ M. Cells were lysed at different times post-infection using lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, Complete protease inhibitor cocktail 1x (Roche Applied Science)) and incubated for 2 h on ice. Lysates were pre-cleared with 20 μ l of protein G-agarose beads for 30 min on ice with gentle shaking and centrifuged by a quick-spin for 30 sec at 10 000 \times g. Supernatants were incubated with specific antibody, either anti-capsid (3C9) or anti-ubiquitin (P4D1, Santa Cruz) antibodies for 1 h on ice, with gentle shaking. 50 μ l of protein G-agarose beads were then added, and further incubated at least 2 h. Beads were pelleted by quick-spin centrifugation, and washed 3 times with lysis buffer, 2 times with washing buffer 1 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.1 % NP-40) and once with washing buffer 2 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 % NP-40). For each wash, 500 μ l of buffer was added and incubated 5 min on ice with agitation before a quick-spin. Proteins were eluted with 2X SDS-PAGE sample buffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 5% β -mercaptoethanol) in boiling water for 5 min. Samples were separated by 10% SDS-PAGE and transferred on nitrocellulose membranes. Primary antibodies (rabbit α -VP2 1:1000 or mouse α -Ub 1:200) were diluted in 5% milk in 1X TBS buffer (10 mM Tris-Cl pH 8.0, 150 mM NaCl) and incubated with the membrane for 1h with agitation. Anti-mouse or anti-rabbit antibodies conjugated with alkaline phosphatase (AP) were used as secondary antibody (diluted 1:1000 in 5% milk in 1X TBS buffer). Detection was performed directly on the membrane using the colorimetric AP substrate NBT-BCIP, according to manufacturer's recommendations (Roche).

Confocal microscopy

Cells were plated, treated as indicated, infected with NADL-2 and indirect IF was performed as described above. Fixed coverslips were treated with mouse anti-capsid 3C9 antibody. Goat anti-mouse antibodies coupled with Alexa 488 were used as secondary antibody. Images were collected on a Bio-Rad Radiance 2000 confocal system, with Ar-Kr laser and a 60x N.A. 1.4 oil objective. Fluorescence was detected at 515 nm.

Statistical analysis

Data was analyzed by the unpaired two-tailed T test, using 99% confidence intervals. Analyses were performed with GraphPad Prism 5 software.

Results

Overall PPV replication kinetics

The general replication kinetics of the NADL-2 strain of PPV on PT cells is shown in Fig. 1. The first steps of the infection were followed by indirect immunofluorescence detecting viral capsids (monoclonal 3C9 antibody) after infection at high MOI (50 FFU/cell). After cell entry, capsids accumulated on one side of the nucleus by 4 to 8 h post-infection (p.i). Newly synthesized virions were found in the nucleus by 16-20 h p.i., before cell lysis (Fig. 1A). DNA replication, monitored by quantitative PCR (qPCR) on cell lysates after infection at low MOI (0.1 FFU/cell), started at 8-12 h p.i. (Fig. 1B).

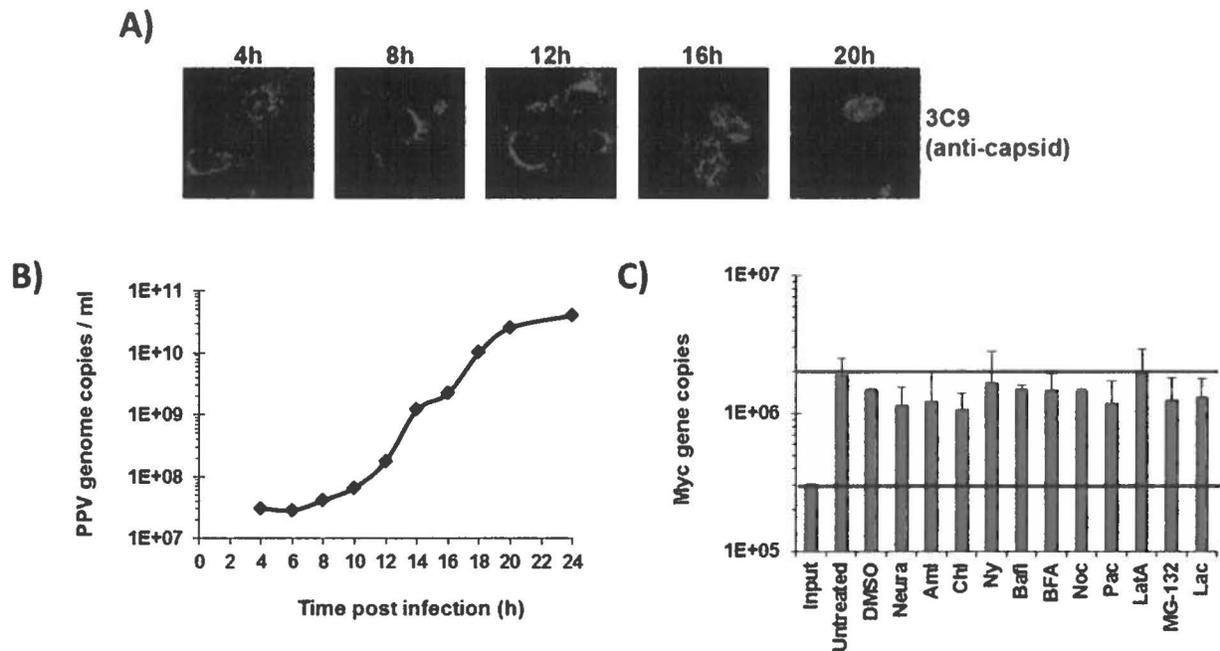


Figure 1. Kinetics of PPV infection.

A) Detection of viral capsids at different times post-infection (p.i.) in porcine testis (PT) cells, by immunofluorescence using capsid-specific 3C9 antibody and Alexa 488-coupled secondary antibody. **B)** Amplification of viral genome. Quantitative PCR (qPCR) specific to PPV performed on cell lysates collected at different times p.i.. **C)** Cell DNA content in presence of inhibitors, as an indication of side effects of the inhibitors on cell growth, determined by qPCR with c-myc gene specific primers, after 20 h incubation with the optimal dose of each inhibitor.

Inhibitors optimization

All inhibitors were tested for toxic effects on the cells used in this study (PT cells) by the MTT assay (Sigma). The toxic doses, being the first concentration having an effect on cell viability are shown in Table 1. Then, a dose-response curve was obtained to determine the concentration having the most effect on viral infection (data not shown). The optimal dose of each inhibitor could be defined as the concentration displaying the best inhibition effect on viral infection, without being toxic for the cells (Table 1).

Table 1 : Chemical inhibitors

Cellular component	Inhibitor	Effect on cells	Optimal concentration*	Toxicity**
Sialic acids	Neuraminidase	Catalyzes the hydrolysis of N-acetylneuraminic acids on cell surface glycoproteins	5 mU/ml	20 mU/ml
Clathrin	Chlorpromazine	Inhibits pit formation by clathrin relocation at the endosomes	10 μ M	100 μ M
	K ⁺ depletion	Aggregates clathrin in empty small cages	Buffer	-
Caveolae	Nystatin	Inhibits caveolin pit formation, sequesters cholesterol	100 μ M	1 mM
	Methyl- β -cyclodextrin	Inhibits cholesterol translocation toward lipid rafts	1 mM	10 mM
Macropinocytosis	Amiloride	Inhibits Na ⁺ /H ⁺ -ATPase exchangers, preventing membrane extension formation	100 μ M	>250 μ M
	Cytochalasin D	Inhibits actin polymerisation for membrane extension	50 μ M	75 μ M
Microtubules	Nocodazole	Inhibits tubulin sub-units polymerisation, inhibits endosomes trafficking	10 μ M	100 μ M
	Paclitaxel	Inhibits microtubules dynamics, preventing depolymerisation	0,5 μ M	1 μ M
Actin	Cytochalasin D	Inhibits actin polymerisation (binds to filaments)	50 μ M	75 μ M
	Latrunculin A	Inhibits actin polymerisation (binds to monomers)	0.1 μ M	0.5 μ M
Endosomal pathway	Bafilomycin	Inhibits endosomal acidification through vacuolar H ⁺ /ATPase pumps block	100 nM	500 nM
	Brefeldin A	Inhibits translocation to late endosomes	500 nM	1 μ M
Proteasome	MG-132	Inhibits the 26S sub-units of the proteasome, preventing proteolytic activity	1 μ M	10 μ M
	Lactacystin	Inhibits the β sub-units of the proteasome, preventing proteolytic activity	5 μ M	10 μ M

* Chosen concentrations shown in the Results section displaying optimal inhibition of PPV replication without significant side effects (MTT assay)

** Toxic doses of the inhibitors were determined by MTT assay

The effect of the inhibitors on cell growth was also evaluated by incubating cells with the optimal dose of each inhibitor for 20 h. qPCR using specific c-myc gene primers was performed to evaluate cell density. As demonstrated in Fig. 1C, the inhibitors used in this study failed to have any significant short-term effect on cell growth. This result correlated with the MTT assay.

Binding of PPV on cells

The efficiency of the infection was evaluated at 20 h p.i. by immunofluorescence, comparing the number of capsid-positive cells to the total cell number on each slide. The effect of each inhibitor was expressed as the relative efficiency of infection to that of untreated cells. The first step of PPV infection was determined to be the binding of the capsid to sialic acid on cell surface glycoproteins. As shown in Fig. 2A, neuraminidase treatment of the cells, which cleaves sialic acids at the cell surface, greatly impeded viral infection, in a dose-dependent manner. Moreover, the infection could be partially reconstituted after rebuilding sialic acid moieties using either α -(2,3)-O-sialyltransferase or α -(2,3)-N-sialyltransferase (10 mU). Therefore, both O- and N-linked sialic acids seem to be used by the virus to enter the cells (Fig. 2B). Cells were capable of rebuilding some receptors by themselves since removal of the neuraminidase, without adding any enzyme, doubled the number of infected cells. Presence of the donor only (cytidine 5'-monophospho-N-acetylneuraminic acid) did not help receptor reconstruction, nor increase the infection. Finally, adding each sialyltransferase alone or in combination did not reconstitute the infection to a 100% level, even when more enzyme was added (up to 25 mU, data not shown).

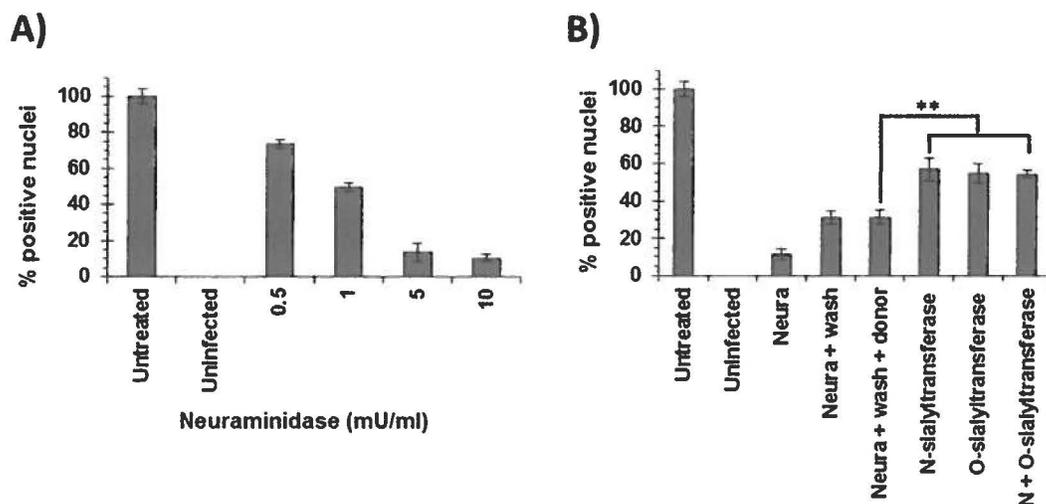


Figure 2. PPV binding on cell surface

A) PT cells were treated with increasing amounts of neuraminidase, to remove sialic acid moieties on cell surface glycoproteins. After washing, PPV was added to cells for 2 h. Unbound virus was removed by washing at 2 h p.i., and infection was pursued for an additional 18 h. The percentage of infected cells was compared to that of untreated cells (arbitrarily set at 100%) by IF with 3C9 capsid antibody, and DNA staining (Hoechst). B) Efficiency of infection recovery after neuraminidase treatment followed by specific reconstruction of sialic acids, using O- or N-sialyltransferases, on the cell surface proteins prior to infection. Percentages of infected cells were also determined by IF (T-test value ** $P < 0.004$).

Viral entry into cells

To investigate pathways implicated in PPV entry, multiple inhibitors were used to target each pathway. A description of these inhibitors, and the concentrations used in this study, is shown in Table 1. After one infection cycle (20 h), percentages of infected cells in presence of the inhibitors were compared to untreated cells. Results shown in Fig. 3A (optimal doses only) demonstrated that both clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis were important for PPV entry. Caveolae inhibition had no effect on viral entry. These results were confirmed by qPCR of cell lysates at 20 h p.i. using PPV-specific primers (Fig 3B). However, complete inhibition could not be achieved, even when clathrin and macropinocytosis inhibitors were combined, suggesting that one or more other entry pathways may be important for PPV. In both cases (% of infection, and genome replication), the inhibition level was about 50%. As a control, the effect of the inhibitors on viral binding to the cell surface was also evaluated. Virus was incubated with inhibitor-treated cells at 4°C. Cells were then washed or not before incubation for 20 h at 37°C. Results in Fig. 3C show that neither clathrin, caveolae or macropinocytosis inhibitors had any effect on PPV binding to the cell surface. Furthermore, the inhibitors acted only during entry steps, as demonstrated in pulse experiments (Fig. 3D), and addition of each inhibitor at 2 h p.i. or later had no detectable effect on PPV infection. Finally, the same results were observed when the inhibitors were present throughout the infection or only during entry, suggesting that there were no significant secondary effects on the cells.

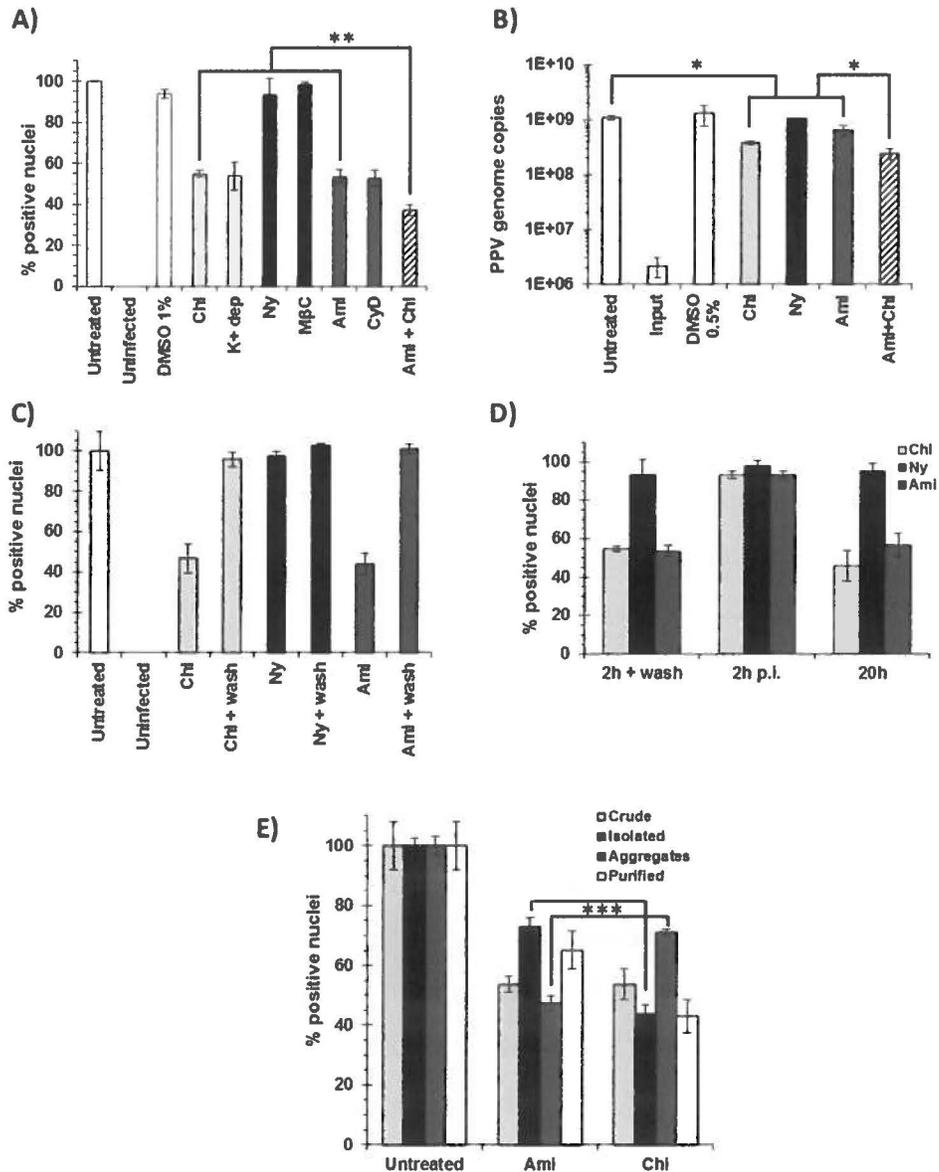


Figure 3. Entry pathways

A) Inhibition of the major cellular entry pathways during PPV infection. Optimal concentration of inhibitors was used, for clathrin endocytosis [chlorpromazine and K⁺ depletion (light grey)], caveolae [nystatin and methyl-β-cyclodextrin (black)] and macropinocytosis [amiloride and cytochalasin D (dark grey)]. Percentage of infected cells was determined at 20 h by indirect IF experiments as described in Fig. 2. Combination of clathrin and macropinocytosis inhibitors (striped) failed to completely abolish infection (T-test value ** P<0.005). B) Inhibition of genome replication measured by qPCR with specific PPV primers after treatment with inhibitors as in Fig. 3A (T-test value * P<0.05). C) Binding assay. Inhibitors were only present for the first 2 h with PPV at 4°C, and removed at the time of washing to eliminate unbound virus. The infection was continued in normal cell culture medium for 20 h. D) Pulse inhibition. Clathrin endocytosis and macropinocytosis inhibitors were either added prior to infection, present only for the first 2 h of infection and washed added 2 h p.i. or left during the whole infection. E) Inhibition of distinct particle types. Crude preparations (infected cell culture supernatant, light grey), isolated particles (black), aggregates (dark grey), both separated by low-speed centrifugation of the crude preparation, and purified particles (white). Inhibition of the clathrin and macropinocytosis pathways for each particle type, infections were carried out with the same amount of PPV, as determined by qPCR (T-test value *** P<0.001).

The importance of both specific and nonspecific pathways prompted us to further examine different arrangements of viral particles. When PPV was amplified in cell culture, a suspension containing virus and cell fragments was obtained after virus-induced cell lysis. These preparations contained isolated viruses and clumps of PPV particles (aggregates), as observed by electron microscopy (data not shown), which could be separated through low-speed centrifugation. Four different viral stocks were used to compare the different inhibitors. The first was the crude preparation containing both types of particles. The aggregates were found in the centrifugation pellet, reconstituted with the same volume of cell culture medium while single particles remained in the centrifugation supernatant. Finally, purified particles were isolated by ultracentrifugation on sucrose cushions. Approximately, the same amount of infectious particles and genome copies were obtained as isolated particles and aggregates preparations (demonstrated by viral titration and quantitative PCR, data not shown). The ability of each of these particle types to initiate infection was compared in combination with the entry inhibitors. Results shown in Fig. 3E indicated that single particles were more sensitive to inhibition by chlorpromazine, meaning that they entered preferably via clathrin-mediated endocytosis. Alternatively, infection with aggregates of virus was greatly inhibited by amiloride indicating that macropinocytosis was more important for those particles. As expected, inhibition of virus in the crude preparation was found to be intermediate of the two types of particles, and purified virus acted as single particles. Nevertheless, the infection could not be inhibited by more than 60%, strengthening the hypothesis that an additional, unknown entry pathway would be important for PPV entry.

Cytoplasmic transport toward the nucleus

After endocytosis, the viral particles likely proceed in the endosomal pathway. Chemical inhibitors were used to evaluate the implication of these cellular components in PPV infection (Table 1). First, dose-response curves were obtained for each inhibitor (data not shown) as described in the viral entry section and when combined with MTT assay results, optimal concentrations of each inhibitor were determined. As described above, relative percentages of infected cells were obtained after treatment with optimal

doses of each inhibitor. Results shown in Fig. 4A demonstrate that endosomal acidification and trafficking to the late endosomes were essential for proper PPV infection (inhibition with Baf and BFA). PPV then likely exits the endosomal pathway via its PLA2 activity to reach the cytoplasm, where the main transport pathways to the nucleus are the microtubules (Mts) and actin networks. Transport by the Mts would be more efficient since they polymerize from the MTOC located next to the nucleus. Both the Mts and actin networks were found to be important, although the inhibitors could not completely abolish the infection (Noc and Lat A). Mts' dynamic instability of polymerization-hydrolysis was also important, since fixation of the Mts structure (Pac) also inhibited the infection. These results were confirmed by qPCR as shown in Fig. 4B.

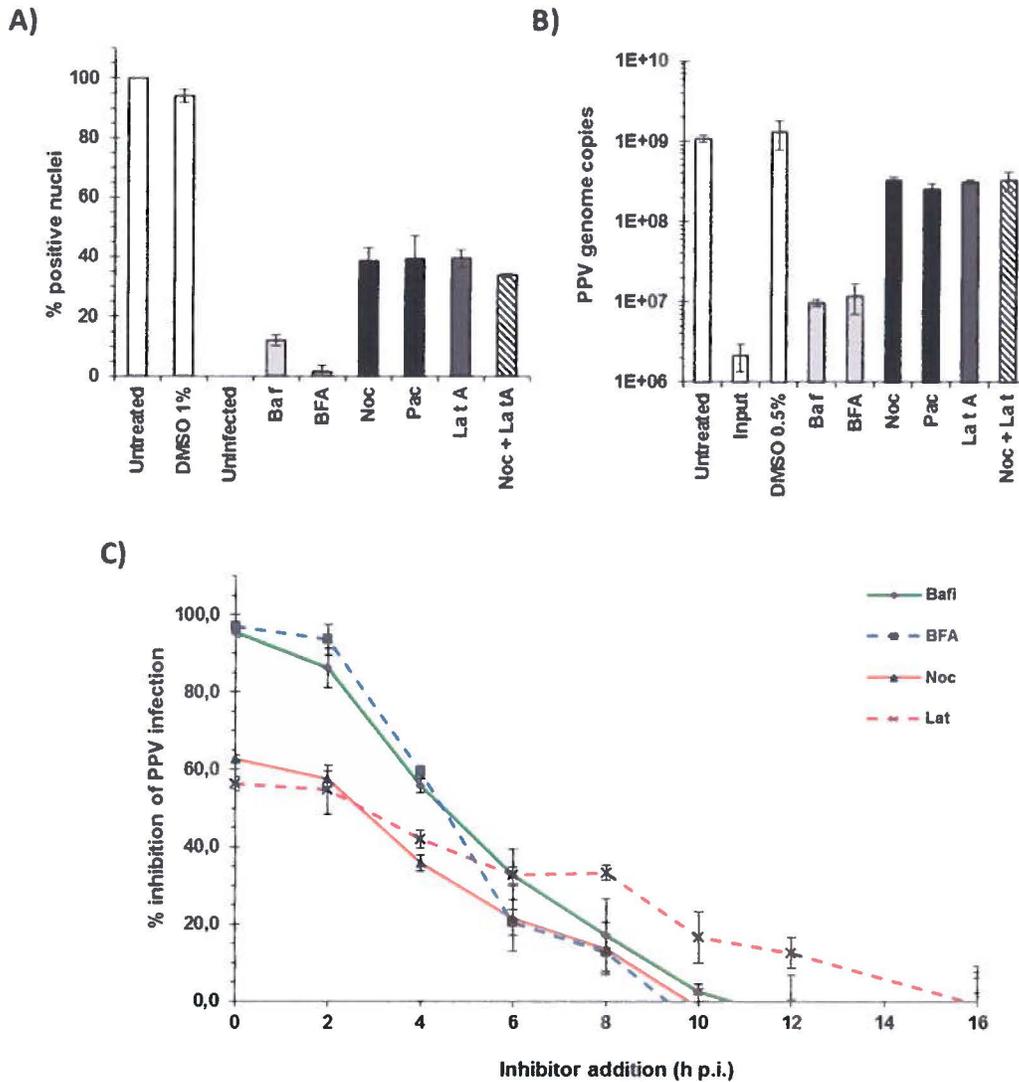


Figure 4 Cytoplasm trafficking toward the nucleus

A) Inhibitors of the endosomal pathway and acidification (light grey), microtubules (black) and actin networks (dark grey) were used to evaluate their necessity for PPV infection. Relative percentage of infection at 20 h p.i. in the presence of optimal concentrations of the inhibitors as measured by indirect IF, as described in Fig 2. **B)** Impact of the inhibitors on genome replication measured by qPCR normalized to cell numbers, as described in Fig. 3 (T-test value ** $P < 0.003$). **C)** Pulse inhibition. Inhibitors were added at different times p.i., and left until 20 h p.i. and percentages of infected cells were determined (T-test value * $P < 0.03$, between Noc and LatA curves).

Pulse inhibition experiments were performed by adding inhibitors at different times throughout the infection. This provided an estimation of the period during which the cellular components were important for the infection. As illustrated in Fig. 4C, the endosomal pathway inhibitors were mostly effective in the first hours of infection. While

the Mts inhibitor was also most efficient during the first 10 h, comparable to endosomal pathway inhibitors, the actin inhibition curve was above the one for the Mts, indicating that the actin network remained important later in the infection.

Proteasome

The proteasome machinery is critical for host-cell defense, and can lead to abortive infections via capsid degradation early in infection (Douar *et al.*, 2001). On the other hand, partial degradation by the proteasome can facilitate some viral infections (Ros *et al.*, 2004). Two proteasome inhibitors were used to evaluate the impact of the proteasome on PPV infection (MG-132, lactacystin, Table 1). As demonstrated in Fig. 5A and 5B, inhibition of the proteasome almost completely abolished PPV infection. These results were further confirmed by qPCR, in Fig. 5C. Pulse inhibition was also performed as described for cytoplasmic trafficking and demonstrated that proteasome was important up to 12 h of infection (Fig. 5D).

Cellular localization of the virus, in the presence of MG-132, was estimated by confocal microscopy. After treatment with the inhibitor, the cells were infected with PPV and fixed at different times during the infection and processed for indirect immunofluorescence with capsid-specific antibody (Fig. 5E) In the presence of MG-132, PPV was still able to reach the nuclear periphery, but capsids remained more diffuse than non-treated cells. At 20 h p.i., very few virus-positive nuclei were observed, supporting the fact that the infection was not productive.

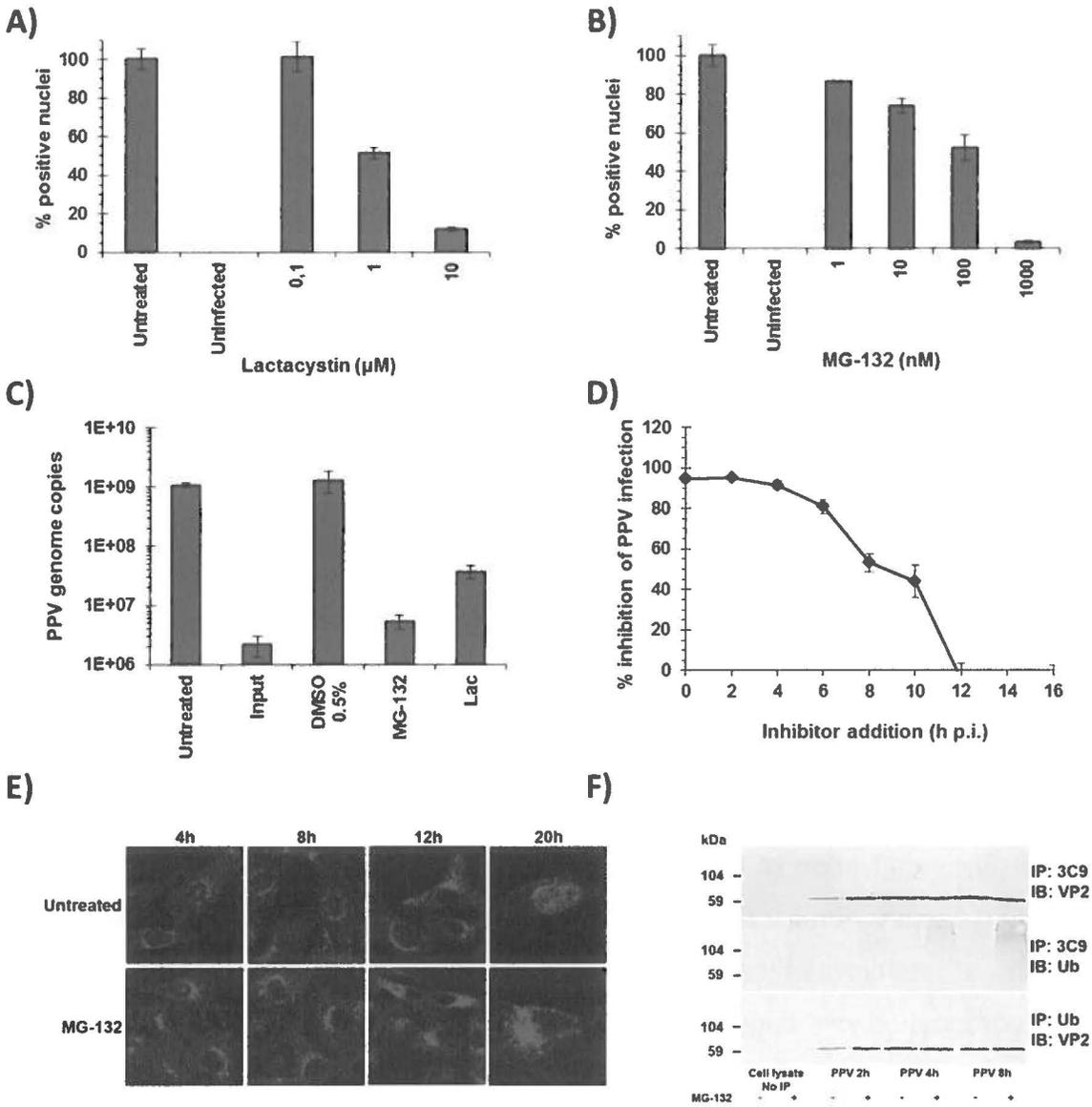


Figure 5. Proteasome involvement

A - B) Inhibition of the proteolytic activity of the proteasome aborted PPV infection. Effect of the inhibitors was evaluated by indirect IF experiments as described in Fig 2, expressing the relative percentage of infected cells at 20 h p.i. compared to mock-treated cells (infection arbitrarily set at 100%). **C)** Same experiment as in Fig. 5A and B, inhibition of genome replication measured by qPCR for PPV, normalized to cell numbers, as described in Fig. 3. **D)** Pulse inhibition. MG-132 was added at different times throughout the infection until cell fixation and the percentage of infected cells was determined. **E)** Capsid localization in presence of MG-132. Capsids were visualized at different times throughout the infection by capsid-specific 3C9 antibody. In untreated cells, PPV reached perinuclear localization within 4 h p.i. and new virus was observed in the nucleus at 20 h p.i. Virus was also observed near the nucleus after MG-132 mediated inhibition, but remained more diffuse in the cytoplasm (8-12 h p.i.), very few positive nucleus were visible at 20 h p.i.. **F)** Co-immunoprecipitation of ubiquitin with anti-PPV capsid antibodies and VP2 capsid proteins co-immunoprecipitation with ubiquitin antibodies. Capsid proteins were observed in all ubiquitin precipitations. The ubiquitin signal in capsid immunoprecipitation was more diffuse as generally observed for ubiquitinated proteins.

The most characterized proteasome targeting mechanism is ubiquitination (Pickart, 2001). After covalent linkage through lysine residues of several ubiquitin subunits to the targeted protein, it is unfolded and fragmented into small sub-units that are further degraded by proteases to single amino acids. Co-immunoprecipitation of viral capsid and ubiquitin showed that PPV capsids were ubiquitinated at 4-12 h p.i. (Fig. 5F), coinciding with the passage through the cytoplasm. Ubiquitin was present after immunoprecipitation of the capsids, in increasing amounts up to 12 h p.i.. Conversely, PPV protein was present after ubiquitin immunoprecipitation. When cells were treated with MG-132, a greater amount of ubiquitin was observed in capsid co-precipitation, suggesting that inhibition of proteasomal processing resulted in greater accumulation of ubiquitin-linked capsid early in infection.

Discussion

Although porcine parvovirus was identified several decades ago, its interactions with host cells remain poorly understood. The early steps of PPV infection were investigated in the current study since they are the keys to establishing a productive infection. Our data demonstrated both similarities and substantial differences between PPV and other closely or distantly related parvoviruses.

Direct probing of virus endocytosis is commonly achieved using pharmacological inhibitors since (i) the effect can be easily evaluated and quantified; (ii), the short time of exposure delays side effects or compensatory mechanisms; and, (iii), all cells are equally exposed. However, potential for poor specificity remains a major concern, in particular if the actin cytoskeleton is affected. None of the common inhibitors of the endocytic pathways possesses an absolute specificity to the targeted component. Therefore, two inhibitors with different actions were used for each cell pathway at relatively low concentrations to minimize side effects. The interpretation of the results required, nevertheless, careful consideration of the degree of selectivity.

Prior treatment of cells with neuraminidase prevented infection emphasizing the pivotal role of sialic acid receptors in infection. This first binding would occur regardless of the entry mode, since the infection could be almost completely inhibited by treating the cells with neuraminidase. Re-sialation experiments (Blackburn *et al.*, 2005, Johnson *et al.*, 2004) on sialidase-treated cells by the enzymes α -2,3-O-sialyltransferase and α -2,3-N-sialyltransferase both partially reconstituted infectivity. Thus sialylglycoprotein receptors available for virus attachment appear to contain both O- and N-linked carbohydrate moieties. However to achieve optimal binding, sialation of the receptors may be more complex than what could be rebuilt *in vitro*, since the combination of the two enzymes could not fully reconstitute viral binding and infection, or require other specific sialic acid derivatives.

Unexpected results were obtained when deciphering the entry mechanisms of PPV. Entry of the virus into cells could not be completely prevented by any of the chemical inhibitors or by their combination. Inhibition of clathrin or macropinocytosis led to about 50% reduction of the infection. Moreover, even when these inhibitors were used in combination, inhibition was only slightly greater (60%). Accordingly, a third unusual or unknown entry mechanism is likely to be involved for PPV and will require further investigation. It is also possible that the inhibitor concentrations used failed to completely block the entry pathways. However, dose-response curves and combinations of inhibitors showed that even beyond toxic doses, up to 40% of cells could still be infected (data not shown). It would be unlikely that the remaining levels of infection would be solely due to imperfect inhibition of the cells. It has been reported that chlorpromazine is able to block macropinocytosis in addition to affecting clathrin-coated pits, whereas amiloride and cytochalasin D may also affect endocytosis via clathrin-coated pits (Elferink, 1979, Kaksonen *et al.*, 2006). However, the contrasting effects of these drugs on isolated and aggregated PPV particles indicated that at the concentrations used, these drugs were sufficiently specific. With less cross reactivity of these inhibitors, the preference for either coated-pit endocytosis or macropinocytosis by

these forms of PPV should be even more significant than the $P < 0.003$ that was observed.

This work is the first demonstration that macropinocytosis, an unspecific entry mode, would be an important entry mechanism for a parvovirus. However, since binding to sialic acid moieties was necessary, a prior binding with an unknown cell surface receptor may upregulate macropinocytosis (Falcone *et al.*, 2006). Most parvoviruses are known to use extensively, if not exclusively, clathrin-mediated endocytosis. Nevertheless, it was recently shown that AAV5, uses both clathrin and caveolae endocytosis to enter cells. Caveolae inhibition had no effect on PPV infection. Canine parvovirus, which uses the transferrin receptor (TfR) for receptor-mediated endocytosis, still infects cells efficiently when deletions or mutations within the cytoplasmic domain of TfR prevented interaction with adapter protein 2 thus abolishing clathrin-mediated uptake (Hueffer *et al.*, 2004), suggesting the existence of a supplementary entry pathway. Therefore, entry of these viruses appears to be more complicated than had previously been assumed. Moreover, even among closely related parvoviruses, there are significant differences in the first steps of infection.

The observed preference for different entry mechanism by isolated and aggregated PPV particles is particularly relevant, since most laboratory studies are based on purified virus (e.g. isolated particles) with cell culture, which may not reflect the natural context of infection in the host. Indeed, it is most likely that some aggregates form when cells are destroyed by the virus, and those aggregates would be in contact with neighboring cells.

As demonstrated in this study, endosomal acidification and trafficking to the late endosomes are both essential for PPV since treatment of the cells with either bafilomycin or brefeldin A (respectively) almost completely abolished the infection (Fig. 4). Transport through the endosomal pathway may trigger conformational changes that

enable further steps of PPV infection as shown for MVM (Ros *et al.*, 2002). Indeed, the amino-terminal part of the VP1 protein must be externalized from the capsid. This capsid protein contains a phospholipase A2 motif and its activity is essential for breaching vesicular membranes (Farr *et al.*, 2005). Finally, since endosomes are transported on Mts, which are polarized towards the nucleus, vesicular traffic of PPV to the late endosomes or lysosomes would provide a means for the virus to reach the perinuclear area.

Mts and actin the two major cell transport structures, were also shown to be involved in PPV infection. Indeed, inhibition of either structure reduced the infection up to 60%. However, since the inhibition was not complete, even when both inhibitors were combined (Noc + Lat A) it is possible that destruction of the normal cell structure is toxic and total inhibition cannot be achieved without killing the cells. Most interestingly, the virus seemed to utilize each transport structure at different times post-infection. MTs were mostly important in the first 8-10 h of infection, correlating with the time-frame of endosomal acidification and traffic to the late endosomes. In contrast, the actin network was involved later in the infection, up to 12-16 h p.i.. These results suggest that MTs are mostly important for the transport of the virus while in the endosome pathway while actin could also be involved later in the infection cycle, such as during transport of the newly synthesized proteins to the nucleus. The effect on the actin network may also indirectly affect the infection.

The proteasome activity was crucial for PPV infection (Fig. 5). In presence of two commonly used proteasome inhibitors, MG-132 and lactacystin, the virus stayed more diffused in the perinuclear region and very low replication was observed. These results strongly suggested that interaction with the proteasome occurred during the last transport steps before delivery of the genome to the nucleus. Moreover, proteasomal processing would take place only in early infection, since addition of the inhibitor at 12h p.i. had no effect on viral infection. Such a necessity for an interaction with the proteasome has already been demonstrated for MVM (Ros *et al.*, 2002, Ros *et al.*,

2004), which is in contrast to its inhibitory effect on infection by AAVs (Douar *et al.*, 2001). Protein degradation by the proteasome proceeds by ubiquitination of the target (Kornitzer *et al.*, 2000). Co-immunoprecipitation experiments demonstrated that PPV capsid proteins were indeed ubiquitinated early in infection (Fig 5F), yet no significant degradation of the viral protein could be demonstrated in co-IP experiments (Fig 5F lower panel), and on western blot performed directly on cell lysate (data not shown). However, since the infectivity ratio of PPV is very low (1 infectious particle for at least 1000 capsid) we cannot rule out that degradation remained undetected. Although degradation is a common result of ubiquitination, other purposes, such as differential interaction with cellular components, may be triggered by this modification (Lin *et al.*, 1996, Mukhopadhyay *et al.*, 2007, Welchman *et al.*, 2005). The exact role of ubiquitination and proteasomal processing of PPV during entry thus remains to be determined.

In summary, the investigation of PPV entry and transport events within the cell has provided some unique results when compared to known pathways of parvoviral infection. Indeed this is the first description of the importance of macropinocytosis as an additional entry portal into the cells. These results also highlighted the fact that particle types may play an underestimated role in preferential uptake of viruses by the cells. Taken together, this may explain why it has been a substantial challenge to identify specific receptors for many viruses including members of the Parvoviridae family.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to P.T. and scholarships from the Fondation Armand-Frappier to M. B. and S. F.. Authors also wish to thank Marcel Desrosiers for technical expertise in confocal microscopy and Micheline Letarte for electronic microscopy.

CHAPITRE 3 : DEUXIÈME ARTICLE

Classic nuclear localization signals and a novel nuclear localization motif are required for nuclear transport of porcine parvovirus capsid proteins

Accepted by Journal of virology (2014-07-24; JVI01717-14R1)

Running title: Nuclear targeting of PPV capsid proteins

Maude Boisvert, Véronique Bouchard-Lévesque, Sandra Fernandes[‡], and Peter Tijssen[#]

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

[‡]Current address:

SUNY Upstate Medical University
750 E. Adams Street, 2204 Weiskotten Hall
Syracuse, NY 13210

[#]Corresponding author: Peter Tijssen

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

Email: peter.tijssen@iaf.inrs.ca
FAX: (450) 686-5627
Telephone: (450) 687-5010 ext 4525

Abstract word count: 229

Article word count: 6344

Résumé de la publication

Titre : Des signaux de localisation nucléaire classiques et un nouveau motif de localisation nucléaire sont requis pour le transport au noyau des protéines de la capsidie du parvovirus porcin

Le transport au noyau des protéines de la capsidie (VPs) est important pour livrer le génome au noyau et précède l'assemblage de la capsidie dans le cycle de réplication du parvovirus porcin (PPV). Les régions contenant plusieurs acides aminés basiques correspondant à des signaux de localisation nucléaire (NLS) potentiels ont été trouvées seulement dans la région unique de VP1 (VP1up). Sur ces cinq régions basiques (BR) identifiées, trois étaient importantes pour la localisation nucléaire de VP1up : BR1 était un NLS classique de type Pat7 et la combinaison de BR4 et BR5 était un NLS bipartite classique. Ces NLS étaient essentiels pour la réplication virale. VP2, la protéine majoritaire de la capsidie ne contient pas ces NLS, ni de région avec plus de deux acides aminés basiques à proximité. Cependant, trois régions basiques ont été trouvées sur la structure de la protéine repliée et assemblée en trimère. Des expériences de mutagenèse ont montré qu'une seule de ces régions était impliquée dans le transport de VP2 au noyau. Ce NLS structural, nommé motif de localisation nucléaire (NLM), est localisé à l'intérieur de la capsidie, et peut donc seulement être utilisé pour transporter les trimères au noyau dans les étapes tardives de l'infection. Il ne peut pas être utilisé pour le transport des capsides au noyau lors de l'infection précoce. Les deux NLS de VP1up se situent dans la région N-terminale de la protéine. Celle-ci est externalisée de la capsidie pendant le passage dans la voie endosomale, ce qui les rend accessibles les NLS pour le transport au noyau lors de l'infection précoce. Globalement, les déterminants du transport au noyau du PPV sont différents comparativement aux proches parents parvovirus.

Contribution des auteurs

Le projet a d'abord été élaboré par Véronique Bouchard-Lévesque et Sandra Fernandes (NLS) et Véronique a effectué les premières expériences avec une construction de VP1up-mCherry (non montré). Puis le projet a été repris par Maude Boisvert avec une construction protéique plus grande et incluant une région basique de plus. La seconde partie (NLM) a été élaborée par Maude Boisvert et Peter Tijssen. Les expériences et les figures présentées dans cet article ont été effectuées par Maude Boisvert. Le manuscrit a été rédigé par Maude Boisvert et révisé par les quatre auteurs.

ABSTRACT

Nuclear targeting of capsid proteins (VPs) is important for genome delivery and precedes assembly in the replication cycle of porcine parvovirus (PPV). Clusters of basic amino acids, corresponding to potential nuclear localization signals (NLS), were found only in the unique region of VP1 (VP1_{up}). Of the five identified basic regions (BR), three were important for nuclear localization of VP1_{up}: BR1 was a classic Pat7 NLS and the combination of BR4 and BR5 was a classic bipartite NLS. These NLS were essential for viral replication. VP2, the major capsid protein, lacked these NLS and contained no region with more than two basic amino acids in proximity. However, three regions of basic clusters were identified in the folded protein, assembled into a trimeric structure. Mutagenesis experiments showed that only one of these three regions was involved in VP2 transport to the nucleus. This structural NLS, termed the nuclear localization motif (NLM), was located inside the assembled capsid, and thus can be used to transport trimers to the nucleus in late steps of infection but not for virions in initial infection steps. The two NLS of VP1_{up} are located in the N-terminal part of the protein, externalized from the capsid during endosomal transit, exposing them for the nuclear targeting during early steps of infection. Globally, the determinants of nuclear transport of structural protein of PPV were different from those of closely-related parvoviruses.

IMPORTANCE

Most DNA viruses use the nucleus for their replication cycle. Thus, structural proteins need to be targeted to this cellular compartment at two distinct steps of the infection: in early steps to deliver viral genomes to the nucleus and in the late steps to assemble new viruses. Nuclear targeting of proteins depends on the recognition of a stretch of basic amino acids by cellular transport proteins. This study reports the identification of two classic nuclear localization signals in the minor capsid protein (VP1) of porcine parvovirus. The major protein (VP2) nuclear localization was shown to depend on a complex structural motif. This motif can be used as a strategy by the virus

to avoid transport of incorrectly folded proteins and selectively import assembled trimers into the nucleus. Structural nuclear localization motifs can also be important for nuclear proteins without classic basic amino acids stretch, including multimeric cellular proteins.

INTRODUCTION

Porcine parvovirus (PPV, newly reclassified as “ungulate protoparvovirus”) is a member of the *Protoparvovirus* genus of the *Parvovirinae* subfamily of the *Parvoviridae* family (Tattersall *et al.*, 2006). It is an important cause of reproductive failure in swine (Dunne *et al.*, 1965, Mengeling *et al.*, 1976). Infection of sows hardly results in clinical signs but some strains can breach the placental barrier and reach the foetus (Mengeling *et al.*, 1976). Infection can then result in death of the foetus depending on the strain and time of gestation at which infection occurred (Choi *et al.*, 1987, Cutlip *et al.*, 1975, Mengeling *et al.*, 1984). Despite the fact that vaccines are widely used and efficiently prevent reproductive problems, the virus can still replicate and be shed from infected sows (Jozwik *et al.*, 2009). This results in constant presence of PPV in herds enabling occurrence of mutated field strains. This virus has a single-stranded DNA genome (ssDNA), known to have a high mutation rate (Streck *et al.*, 2011). Monitoring emergence of new strains and understanding cell-virus interactions are therefore important to gain a better knowledge of the life cycle of this pathogen.

The limited coding capacity (5kb) of parvoviruses suggests that they require elaborate and efficient interactions with infected cells, and possibly many cellular proteins are required for proper infection. Likewise, early PPV infection begin with at least two entry mechanisms inside the cells: clathrin-coated endocytosis and macropinocytosis (Boisvert *et al.*, 2010). While in the endosomal pathway, acidification and translocation to late endosomes are required (Boisvert *et al.*, 2010). This environment triggers conformational changes in the virion, leading to externalization of the N-terminus of capsid proteins (Venkatakrishnan *et al.*, 2013). PPV capsids consist of two proteins. VP2, the major protein, is cleaved into VP3 in the endosomes (Farr *et*

al., 2006, Ros *et al.*, 2002, Ros *et al.*, 2006, Sanchez-Martinez *et al.*, 2012) which is believed to create the necessary space for VP1 N-terminus externalization. The VP1 sequence comprises the VP2 sequence with a 150 amino acids N-terminal extension, called VP1up. (Bergeron *et al.*, 1993). VP1up externalization in the endosomes is absolutely required for PPV infection, since it contains the phospholipase A₂ (PLA₂) activity, essential to breach the endosomal membrane barrier (Canaan *et al.*, 2004, Venkatakrishnan *et al.*, 2013, Zadori *et al.*, 2001).

Viral replication of parvoviruses occurs in the nucleus and requires specific transport of capsid proteins towards the nucleus at two distinct steps of the replication cycle. In early steps, incoming capsids need to either enter the nucleus or, at least, dock to the nuclear membrane to inject its viral genome into the nucleus (Cohen *et al.*, 2011, Cohen *et al.*, 2005, Lux *et al.*, 2005, Porwal *et al.*, 2013). In late steps of infection, newly synthesised capsid proteins rapidly assemble into trimers before nuclear transport (Riobos *et al.*, 2006, Wu *et al.*, 1993). In the nucleus, trimers assemble into capsids prior to DNA packaging and export of complete viruses from the cell (Cotmore *et al.*, 2005a). The ratio of VP1 and VP2 proteins in the capsid varies between 1:5 and 1:10, and therefore trimers contained either three copies of VP2 or two copies of VP2 with one copy of VP1 (Riobos *et al.*, 2006, Tullis *et al.*, 1993).

Nuclear transport of small protein (<50 kDa) can be achieved by slow, passive diffusion through the nuclear pore complex (Macara, 2001). Larger proteins require active transport. Classic nuclear transport mechanisms proceed after recognition of a nuclear localization signal (NLS) by the transport machinery (usually importin- α or importin- β) (Macara, 2001). Several NLS have been identified and are composed of a cluster of basic amino acids in close proximity in the protein sequence. Two common motifs are used in bioinformatics to identify potential NLS within a protein sequence. The Pat4 motif consists of four continuous basic amino acids and the Pat7 motif consists of a proline followed by three out of four basic residues after an interruption of

1-3 amino acids (P-X(1-3)-(3-4K/R)) (Macara, 2001). In addition to these “monopartite” NLS, there are also “bipartite” NLS if the transport depends on two basic regions separated by a short nonbasic amino acid linker. A key point to ensure transport is accessibility of the motif to interact with cellular transport proteins. It can help coordinate complex transport, such as required for ribosome formation. The ribosomal subunits, synthesized in the cytoplasm display their NLS to migrate to the nucleus for final assembly and then return to the cytoplasm to exert their functions. Assembly of the ribosomes enables the switch from exposed NLS to exposed export sequences (NES) (Tschochner *et al.*, 2003). This demonstrates that structural dynamics can alter the signals presented by the protein to the nuclear transport machinery. Numerous viruses use classic NLS for nuclear targeting of viral proteins (Krauer *et al.*, 2004, M. Li *et al.*, 2011, Mears *et al.*, 1995).

Several parvovirus structural proteins were shown to contain basic regions (BRs) that can act as nuclear localization signal (NLS). For some viruses, these regions can be found in all structural proteins, (for example AAV-2 (Grieger *et al.*, 2006)), while for others, such as MVM (Lombardo *et al.*, 2002) and CPV (Vihinen-Ranta *et al.*, 1997) active NLS are only found in the VP1 minor protein. Sequence analysis of PPV showed that there are five BRs that could potentially act as NLS, all of them are located in VP1_{up} (Fig. 1). It was also demonstrated for the B19 human parvovirus that an unconventional NLS (KLGPRKATGRW), containing few basic amino acids, was responsible for VP2 protein transport to the nucleus (Pillet *et al.*, 2003). This region is not conserved in PPV (TAKMRSSMNW). Furthermore, another unconventional signal was found in the common region of VP1/VP2 for MVM (Lombardo *et al.*, 2000). This region contained five basic amino acids (K, R) in an 11 amino acid sequence (528-**KGKLTMR**AK**LR**-538, GenBank J02275.1). This region is located in a beta-sheet, enabling close proximity of basic amino acids when the protein is folded and assembled into a trimer. This region is essential for VP2 nuclear localization, and was called the “nuclear localization motif” (NLM) since it was dependant of a correct folding of the protein. This region is well conserved with the closely related canine parvovirus (CPV,

530-KGKLVFKAKLR-540, NCBI: NC_001539.1). However, this region is poorly conserved for PPV. The corresponding beta-sheet in PPV contains only three basic amino acids (525-KGTLTFTAKMR-535 NCBI: NC_001718.1), suggesting that nuclear localization of PPV VP2 depends on a different NLM. Moreover, VP2 does not contain any potential classic NLS, there is no region with more than two basic amino acids in close proximity in the primary sequence of the protein.

In this study, evaluation of the five potential NLS in VP1_{up} by localization of different mutants of a fluorescent fusion protein demonstrated that active NLS were BR1 and BR45, two classic NLS: Pat7 and bipartite respectively. Mutation of both these NLS in the infectious clone resulted in a replication incompetent virus, demonstrating the importance of VP1 NLS for viral replication. Nuclear transport of VP2 protein depended on a structural motif (NLM) that differed from the NLM already identified for MVM, including basic amino acids outside the beta-sheet (Lombardo *et al.*, 2000). This NLM was also required for PPV infection.

MATERIALS AND METHODS

Cell line and viral strains

Porcine fibroblast cells (porcine testis, PT), a clone derived from the ST cells (ATCC CRL-1746) and Cos-7 cells (ATCC CRL-1651) were grown at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium containing D-glucose and L-glutamine, and supplemented with 7% heat-inactivated foetal bovine serum and antibiotics (penicillin/streptomycin), all from Wisent. Viral infections were conducted with the NADL-2 strain of PPV (ATCC VR-742). Viral stocks were obtained by collection of supernatants from infected, lysed cells and used directly in experiments after a brief centrifugation to remove cellular debris.

Virus Titration

Viral titers were obtained as described before (Boisvert *et al.*, 2010) by immunofluorescence (IF) in 96-wells plates, at 20 h post-infection (p.i.) with monoclonal mouse capsid-specific antibody (3C9-D11-H11), together with anti-mouse Alexa Fluor® 488 as secondary antibody (Life Technologies). Capsid-positive, fluorescent nuclei were scored and virus titers were expressed in Fluorescent-foci Forming Units/ml (FFU/ml).

Cloning and mutagenesis of potential NLS

First, the DNA fragment corresponding to amino acids 1 to 412 of VP1 protein (start codon to EcoRI site) was cloned into the pBlueScript KS+ vector for mutagenesis (nucleotide 2287 to 3595 according to GenBank NC_001718). The sequence contained a mutation to inactivate the viral PLA₂ (41-HD/AN) to avoid cellular toxicity when expressing the protein. Basic amino acids of the different basic regions (BR) were mutated into neutral hydrophilic polar amino acids (N, T or Q) to conserve global polarity of the protein. Each BR was inactivated individually and in all possible combination with the others BRs. Mutagenesis was carried out according to the QuikChange® protocol (Stratagene). Final amino acid sequences including the different mutations are presented in Table 1. All resulting proteins (including wild type (wt)) contained the mutation to inactivate the viral PLA₂ (not shown). Mutated sequences were cloned into pcDNA3.1+ vector (Life Technologies) containing the mCherry fluorescent protein sequence. This vector enabled expression of a fusion fluorescent protein to assess the localization of VP1-412 inside the cells. All clones were verified by sequencing, and positive clones were used for transfection experiments.

Cloning of the basic regions with EGFP

To confirm NLS activity of the BRs, they were cloned into pEGFP from Clontech. BR1, BR2, BR3 and BR5, were cloned by oligonucleotide annealing between BspEI and BamHI restriction sites. BR23 and BR45 were cloned by PCR cloning. SV40 NLS

(PKKKRKV) was used as a positive control, and was also cloned by oligonucleotide annealing.

Cloning NLS mutants to the infectious clone

Selected mutations were cloned into the infectious clone of NADL-2 (in pSmart vector) in two steps. First the native PLA₂ sequence was restored by mutagenesis, and then mutations were transferred in the infectious clone using existing cloning sites. All clones were sequenced, and positive clones were used in transfection experiments. Clones that displayed active viral replication were amplified in a small viral stock (no more than 2 passages on cells), and DNA from viral stock was amplified by PCR and sequenced to ensure that no reversion or compensatory mutations arose.

Mutagenesis and cloning of potential NLM

The genome fragment between the natural EcoRI site and the stop codon of the VPs was cloned into pBlueScript KS+ vector for mutagenesis (nucleotide 3590 to 4549 according to GenBank NC_001718). The nucleotides around the stop codon were modified from "ACTAGA" to "ACTAGT" to include a SpeI restriction site, which enabled restoration of the natural viral sequence when cloning with XbaI into the infectious clone. Mutagenesis was used to replace basic amino acids of potential NLM by glycine to give flexibility to the mutated protein. After sequence confirmation, mutations were transferred into the infectious clone of NADL-2 and sequenced again before transfection experiments. Mutagenesis of conserved amino acids of VP2 to alanine was done by site-directed mutagenesis, and the mutations were also transferred into the infectious clone for transfection experiment to assess localization of VP2.

Transfection into PT cells

VP1-412-mCherry constructs (wt and BRs mutants), pEGFP-BRs constructs, and NLM (or VP2) mutated infectious clones were transiently expressed in PT cells. Cells were plated in 24 wells plates with glass coverslips one day prior experiments, to

achieve 80% confluency by next day (5×10^4 cells / well). Transfections were carried out with Lipofectamine 2000 (Life Technologies), according to the manufacturer's instructions (1 μ g DNA per transfection). Incubation was then carried out at 37°C in the dark for 24 h (30 or 48 h for infectious clones). Cells were then fixed in 3% formaldehyde in IF buffer (see immunofluorescence section) for 30 min. For infectious clones, immunofluorescence was performed as described in next section, and DNA was stained with Hoechst 33258 after transfection with mCherry or EGFP clones as described in immunofluorescence section. Coverslips were then mounted on glass slides and kept at 4°C in the dark until analysis. Localization of the fusion proteins was determined using fluorescence microscopy through mCherry or EGFP fluorescence. Results for VP1-412-mCherry localization were expressed in percentage of cells where proteins were present either in the nucleus, diffuse throughout the cell or mostly in the cytoplasm. For each protein construct, at least 300 cells were scored from at least 3 independent transfections experiments.

Immunofluorescence and confocal microscopy

Cells were fixed with 3% formaldehyde in IF buffer (1X PBS, 0.02% sodium azide, 0.1% Tween, 0.1 % BSA) for 30 min and washed 3 times with 1X PBS. Cells were permeabilized with 3% Triton X-100 in IF buffer for 30 min and washed 3 times with 1X PBS. PPV capsids were detected with monoclonal mouse anti-capsid primary antibody (3C9-D11-H11; staining both empty and DNA containing capsids, ATCC CRL-1745, diluted 1:2000 in IF buffer) or polyclonal rabbit anti-VP2 (staining subunits and DNA containing capsids, described in (Zadori *et al.*, 2005), diluted 1:1000 in IF buffer) for 1 h. Cells were washed with 1X PBS and incubated with secondary antibodies, including goat anti-mouse or goat anti-rabbit conjugated with Alexa Fluor® 488 or 568 as indicated (Life technologies, diluted 1:2000 in IF buffer), for 1 h. Finally, DNA was stained with Hoechst 33258 (2 μ g/ml) for 30 min and coverslips were fixed on slides using Fluoroshield™ (Sigma) that were kept at 4°C in the dark until reading. Confocal microscopy images were collected on a Zeiss LSM780 system equipped with 30mW 405 nm diode laser, 25mW 458/488/514 argon multiline laser, 20mW DPSS

561 nm laser and 5mW HeNe 633 nm laser mounted on a Zeiss Axio Observer Z1 and operated with Zen 2011 software (Zeiss). We used a Plan-APOCHROMAT 63x oil DIC 1.4NA objective for our observations. All images were minimally and equally processed to ensure good contrast.

qPCR

In fitness experiments, viral DNA was measured by qPCR from supernatant samples, 24 h post infection. qPCR for mutant IC- Δ BR145 was performed after immunoprecipitation (IP) as described below. After washes, DNA was released by sample boiling in 50 μ l Tris 50 mM pH 7.5, 0.1 % NP40 (final wash solution) for 5 minutes. Samples were diluted 1:10 after elution for PCR purpose. qPCR reactions were done as described before (Boisvert *et al.*, 2010), using either the Sybr mix from ABScience, or from Life Technologies as per manufacturer recommendations. Primer specificity was verified using BLAST analysis and melting curve analysis from 60°C to 95°C. Viral DNA was expressed in genome copies equivalent (GCE) per ml (fitness) or per sample (IP).

Immunoprecipitation and Western blotting

Immunoprecipitation of PPV capsids after transfection with infectious clones were performed as described before (Boisvert *et al.*, 2010). Briefly, cell lysates (pooled from four transfection wells) were first pre-cleared with 20 μ l of protein G-Agarose beads for 2 h on ice. Centrifugation supernatants were transferred into new tubes and IP was done with monoclonal anti-capsid antibody (3C9-D11-H11, diluted 1:10, 20 μ l), and 50 μ l of protein G-Agarose beads O/N at 4 °C. Then, samples were washed and eluted as described before (Boisvert *et al.*, 2010). Samples were loaded on a 10% acrylamide gel and migrated at 200 V for 50 minutes. Proteins were electro-transferred to a nitrocellulose membrane at 300 mA for 60 minutes. Signals were enhanced using Pierce Western Blot Signal Enhancer kit following the manufacturer's protocol. After blocking of non-specific sites with 1.5% non-fat dry milk in TBS-T, membranes were

incubated with primary antibody (polyclonal anti-VP2, 1:1000 in TBT-T) for 1 h, and washed three times with TBS-T. Incubation with the secondary antibody, goat anti-rabbit-AP (Bio Rad, 1:1000 in TBS-T), and washes were performed as for the primary antibody. Detection was performed using NBT-BCIP, as suggested by the manufacturer (Roche). Western blot images were minimally processed to ensure good contrast.

Evaluation of trimer formation

Cos-7 cells were plated and transfected as explained in transfection section. 30 h post transfection, cells were washed three times with 1X PBS. Cells were then treated with the crosslinker DMS (dimethyl suberimidate, Thermo Scientific Pierce) at a concentration of 10 mM in HNEM buffer (50 mM Hepes (pH 8.0), 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA) for 30 minutes. The reaction was quenched by the addition of 10 mM Tris pH 7.5 for 10 minutes. Cells were lysed as explained in immunoprecipitation section. Proteins were separated in 10 % acrylamide gels (SDS PAGE) and electrotransferred to nitrocellulose membrane as described in Western blot section. Western blot was performed with rabbit anti-VP2 primary antibody.

RESULTS

Identification of potential NLS of VP1up and mutagenesis

Basic regions (BRs) possibly involved in nuclear localization of structural protein of PPV were identified as regions containing at least 3 basic amino acids in close proximity. These putative nuclear localization signals (NLS) are highlighted in Fig. 1A. All BRs were located in the VP1 unique part (VP1up). Therefore, no classic NLS were expected in the VP2 protein. BR1 was a potential Pat7 classic motif (Macara, 2001); and the combination of BR4 and BR5 was a potential classic bipartite NLS (Macara, 2001). Comparison with the MVM VP1up sequence showed that BR1, BR2, BR4 and BR5 are conserved between both viruses while BR3 is unique to PPV (Lombardo *et al.*, 2002).

several fluorescent proteins that could potentially result in a structure masking some of the VP1 features that were being investigated (72 kDa for VP1-412-mCherry).

Next, site-directed mutagenesis was performed to inactivate each BR alone and in all possible combinations. Basic amino acids (K, R) were replaced by polar uncharged amino acids (N, Q, T) to conserve global polarity of the protein. Protein sequences of all BRs mutants are presented in Table 1. These constructs also contained the viral PLA₂ inactivation mutation (41-HD/AN-42), since expression of large amounts of VP1 protein in cells could be toxic. Finally, mutated DNA was transferred in pcDNA3.1+ vector for transient expression experiments. This vector also contained the mCherry sequence to produce fluorescent fusion proteins enabling easy localization of the VP1-412-mCherry products (Fig. 1B).

Table 1 Inactivation mutations of putative NLS in VP1up

Mutants	VP1up amino acid sequence																																																							
	BR1	BR2	BR3	BR4	BR5																																																			
	1	9//86	//110	124	137//148-VP2																																																			
wt	m	a	p	a	k	r	r	a	k	r	r	r	s	p	r	k	h	p	g	s	k	p	p	g	k	r	p	a	p	r	h	i	f	i	n	l	a	k	k	k	a	k	//	s	n	s	-	m	s	e	n					
ΔBR1	m	a	p	p	a	n	q	a	r	//	r	a	k	r	//	r	r	s	p	r	k	h	p	g	s	k	p	p	g	k	r	p	a	p	r	h	i	f	i	n	l	a	k	k	k	a	k	//	s	n	s	-	m	s	e	n
ΔBR2	m	a	p	p	a	k	r	a	r	//	t	a	n	t	//	r	r	s	p	r	k	h	p	g	s	k	p	p	g	k	r	p	a	p	r	h	i	f	i	n	l	a	k	k	k	a	k	//	s	n	s	-	m	s	e	n
ΔBR3	m	a	p	p	a	k	r	a	r	//	r	a	k	r	//	t	q	s	p	t	n	h	p	g	s	k	p	p	g	k	r	p	a	p	r	h	i	f	i	n	l	a	k	k	k	a	k	//	s	n	s	-	m	s	e	n
ΔBR4	m	a	p	p	a	k	r	a	r	//	r	a	k	r	//	r	r	s	p	r	k	h	p	g	s	k	p	p	g	n	t	p	a	p	r	h	i	f	i	n	l	a	k	k	k	a	k	//	s	n	s	-	m	s	e	n
ΔBR5	m	a	p	p	a	k	r	a	r	//	r	a	k	r	//	r	r	s	p	r	k	h	p	g	s	k	p	p	g	k	r	p	a	p	r	h	i	f	i	n	l	a	t	n	q	a	k	//	s	n	s	-	m	s	e	n

Roles of basic regions for VP1up nuclear localization

All different VP1-412-mCherry constructs were transfected into porcine PT cells. 24 h post transfection (p.tr.), cells were fixed and DNA was stained. Then, intracellular localization of VP1 fusion proteins was determined by the fluorescence of mCherry. Typical localizations are shown in Fig. 2. Three possible patterns were distinguished, either nuclear (N>C), diffuse (N=C) or cytoplasmic (C>N). Wild type (wt) VP1-412-mCherry was located exclusively in the nucleus of almost all cells (90%). On the other

hand, mCherry expressed alone resulted in a diffuse pattern, indicating that the protein was present both in the cytoplasm and in the nucleus (data not shown). The mCherry protein alone contains no NLS activity but is small enough (25 kDa) to passively diffuse between the two cell compartments.

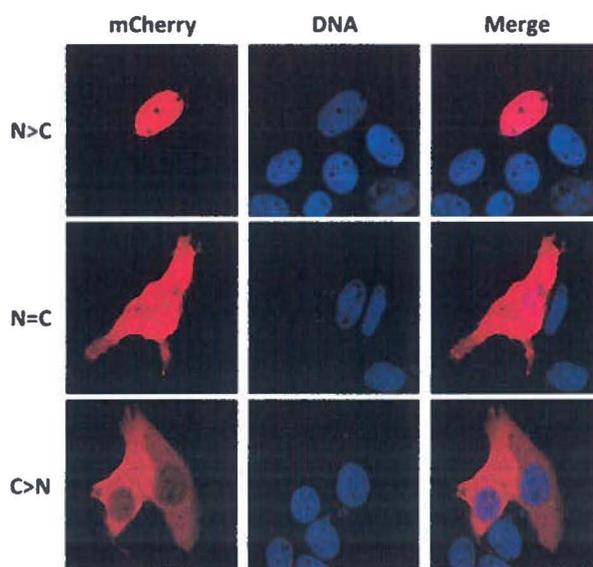


Figure 2. Localization patterns of VP1-412-mCherry mutants. Fusion protein was detected through mCherry fluorescence and nuclei were stained with Hoechst DNA marker. Three different patterns were distinguished. Some constructs were present exclusively in the nucleus, as the wt protein (N>C). Some constructs were equally present in the nucleus and the cytoplasm (N=C), and some were almost exclusively in the cytoplasm (C>N).

Relative proportions of the three localization pattern for each VP1-412-mCherry constructs were scored from at least 300 cells (Fig. 3 A-D). As demonstrated, no single BR inactivation led to efficient inhibition of nuclear localization of VP1-412-mCherry protein. However, mutations in both BR1 and either half of the putative bipartite NLS (BR4 or BR5) resulted in 80% of the protein being diffuse in both the cytoplasm and nucleus, while the protein was exclusively cytoplasmic in the remainder of cells. Further mutations (BR1+BR4+BR5) resulted in 35% of cells with VP1-412-mCherry in the cytoplasm, whereas localization in the rest of the cells was diffuse. BR2 and BR3 mutations did not significantly affect protein nuclear localization alone; however the mutation of all BRs resulted in a greater proportion of cells with the protein only in the

cytoplasm (65%). From all BRs investigated BR1 and the bipartite BR4-BR5 were both shown to display strong NLS activity.

Confirmation of NLS activity

To confirm the classic NLS activity of BR1 and BR45, we cloned these BRs with EGFP. Transfection and confocal microscopy showed that EGFP alone was present in both the nucleus and the cytoplasm, due to its small size (26 kDa, Fig. 3E). EGFP-BR1 and EGFP-BR45 were completely located in the nucleus in almost all cells, confirming NLS activity. In contrast, EGFP-BR2 localization was not different from EGFP alone. EGFP-BR3 and EGFP-BR23 were slightly enriched in the nucleus, confirming weak NLS activity. Cloning only half of the bipartite NLS (EGFP-BR5) resulted in a partial nuclear accumulation. BR4 alone was not cloned with EGFP since it contained only two basic amino acids. Cloning of the classic SV40 NLS to EGFP was used as a positive control of nuclear transport. All pictures in Fig 3E represent the localization that was observed in > 90% of transfected cells for each construct.

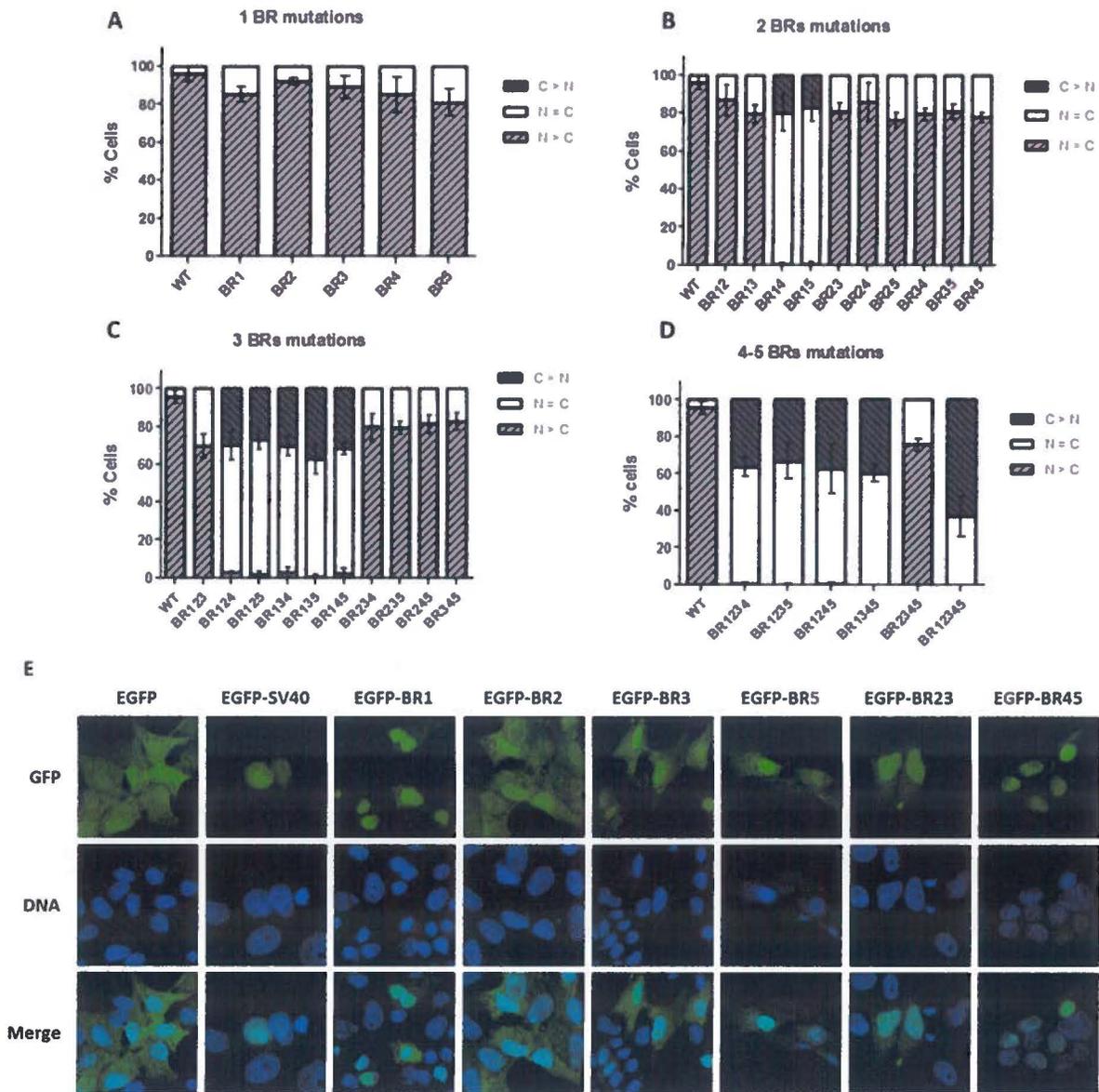


Figure 3. Cellular localization of the VP1-412-fusion mutants.

For each mutant, the percentage of cells displaying fusion protein in the nucleus (N>C, light grey), diffuse (N=C, white) or in the cytoplasm (C>N, dark grey) was scored for at least 300 cells in at least 3 independent transfections. No single mutation resulted in an alteration of protein localization (A). Double mutants containing mutation of BR1 together with BR4 or BR5 resulted in a diffuse localisation of the protein (B). Mutation of three (C) or more (D) BRs confirmed the importance of BR1, BR4 and BR5 for nuclear localization of the fusion protein. (E) Confirmation of NLS activity of BRs. Indicated BRs were cloned in fusion with EGFP, and expressed by transfection of PT cells. Localization of the proteins was evaluated by confocal microscopy in comparison with DNA staining with Hoechst reagent. Images for each clone are representative of three independent transfection experiments.

Roles of VP1up NLS in infection cycle

The effects of these mutations in the context of the whole protein during the course of infection were then investigated. Mutated BR23, BR1, BR45 and BR145 were chosen for further experiments. The mutated sequences were cloned into the PPV infectious clone (IC; with an active PLA₂), and transfected into PT cells. Supernatants were titrated 48 h post transfection. As demonstrated in Fig. 4A, IC-ΔBR1, IC-ΔBR45 and IC-ΔBR23 all produced infectious virions after transfection. However mutant IC-ΔBR145 was completely non-productive, as no infectious virus was detected. These results demonstrated that VP1up NLS are essential for PPV infection. Since results greatly depended on the transfection efficiency of the infectious clones, which is quite low (< 5% efficiency), small viral stocks of the mutants were amplified for regular infection of cells with an MOI of 1. DNA from viral stocks obtained of the various mutants was amplified by PCR and sequenced to ensure that no mutation occurred to restore infectivity (data not shown). Results in Fig. 4B showed that all infections resulted in an equivalent amplification of viral DNA, suggesting equivalent efficiencies for the delivery of the DNA to the nucleus in early infection. Infection with IC-ΔBR23 and IC-ΔBR45 produced slightly less infectious virus (as expressed in FFU, Fig. 4C) and infection with IC-ΔBR1 resulted in a four fold lower FFU production. The GCE/FFU ratios of the mutants were thus higher (FIG 4D), suggesting that a late steps of infection could be less efficient or that capsid is less stable. However, differences observed were all relatively low (<1 log), suggesting that mutations had only minor effect on viral reproduction.

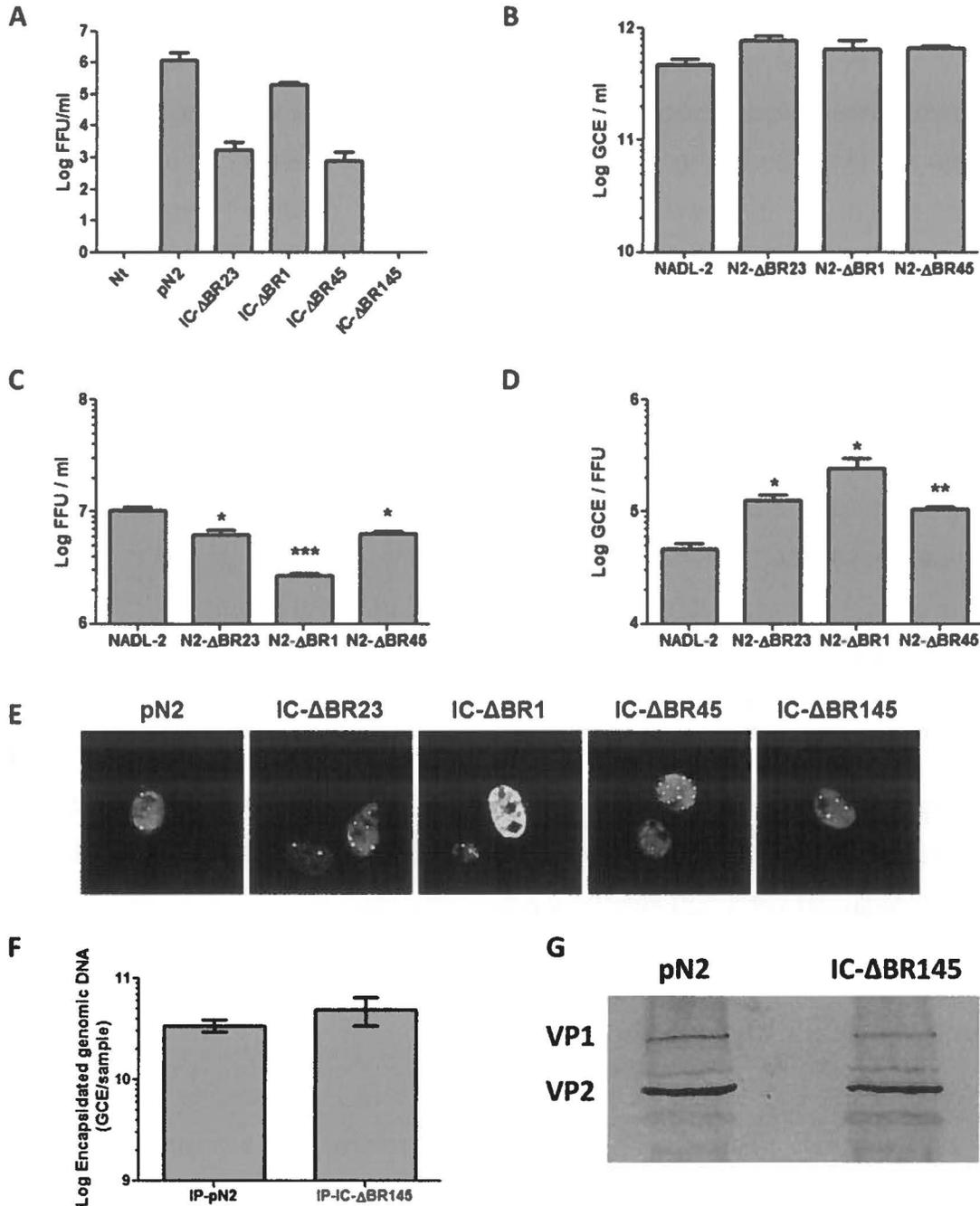


Figure 4. Infectious clones with BRs mutations.

Selected mutations were cloned in the infectious clone of PPV. (A) Transfection and re-infection experiments showed that mutation of one NLS (BR1 or BR45) did not prevented viral amplification. However mutation of both NLS (BR145) completely abrogated viral amplification. Small stocks of replicating mutant infectious clones were made to evaluate the impact of the mutations on viral fitness. All mutants produced equivalent amounts of viral DNA (B), but less infectious particles (C), leading to higher GCE/FFU ratios (D). (E) Transfection of the infectious clone with both NLS mutated led to the formation of capsids 30 h p.i., as efficiently as other mutants and wild-type clones. These capsids were immunoprecipitated, and contained viral DNA (F) and VP1 (G). This indicated that transfection of mutant of regions BR145 produced complete capsids (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$).

Mutant IC-ΔBR145

To rule out the possibility that the mutation affected virus assembly following transfection, immunofluorescence and confocal microscopy was carried out 30 h p.tr. using anti-capsid antibody. Fig. 4E shows that all mutants resulted in a capsid formation that was similar to the wild type infectious clone (pN2). Then, the amount of encapsidated viral DNA was examined by qPCR after immunoprecipitation of the capsid at 30 h p.tr. The clone with both NLS mutated successfully produced full capsids (containing DNA, Fig. 4F). A control qPCR using primers from the infectious clone vector (pSmart) was performed to assess the presence of contaminant transfection DNA in the sample. Results revealed that there was no transfection DNA present in the immunoprecipitation eluted capsids (data not shown). Finally, VP1 incorporation into the capsids was assessed by immunoprecipitation of the capsid at 30 h p.tr. and Western blotting (Fig. 4G) demonstrating that capsids included both DNA and VP1. Transfection with this mutant produced complete virions that were however unable to proceed to a second round of infection. Transfection experiments with infectious clones were inefficient (low % of cells with virus formation), and this technical limitation prevented further characterization and evaluation of the PLA₂ activity, also an essential part of VP1up. Insufficient virus production following transfection of this double NLS mutant clone also precluded immunofluorescence experiments.

Targeting VP2 to the nucleus: NLM

Sequence analysis of VP2 protein showed that there was no region containing more than two basic amino acids in a cluster. Therefore, it was postulated that protein folding and assembly into trimers would generate regions rich in basic amino acids as previously demonstrated for MVM parvovirus. The MVM nuclear localization motif (NLM) consists of a cluster of 5 basic amino acids located in a beta-sheet of 11 amino acids (**KGKLTMRAKLR**) (Lombardo *et al.*, 2000). This motif is highly conserved in the VP2 protein of the canine parvovirus (CPV), but poorly conserved in PPV VP2 (**KGTLTFTAKMR**), containing only three basic amino acids. Moreover, mutagenesis of MVM NLM resulting in a sequence equivalent to the PPV sequence (three remaining

basic amino acids: **KGNLTMTAKLR**) almost completely prevented nuclear localization of MVM VP2 (Lombardo *et al.*, 2000). This suggested that the NLM for PPV might be different from the MVM NLM. We used the data from the crystal structure of PPV and PyMol software to find basic amino acids clusters that could be potential NLMs for PPV. As shown in Fig. 5A, an “external basic cluster”, comprising amino acids R374, R393 and R565, was identified on the exterior face of the assembled capsid. A “central basic cluster” (K475 and R477), was identified in the center of the interior side of the trimer (Fig. 5B), containing six basic amino acids in the assembled trimer. Some amino acids of the NLM of MVM were also conserved such as K525 which is too far from K533 and R535 to act as an NLM like for MVM VP2. However, further analysis of this region showed that K272, K275, K487 and R576 are located in close proximity to K533 and R535, and this region was named the “internal basic cluster” and is also located in the interior face of the capsid (Fig. 5C).

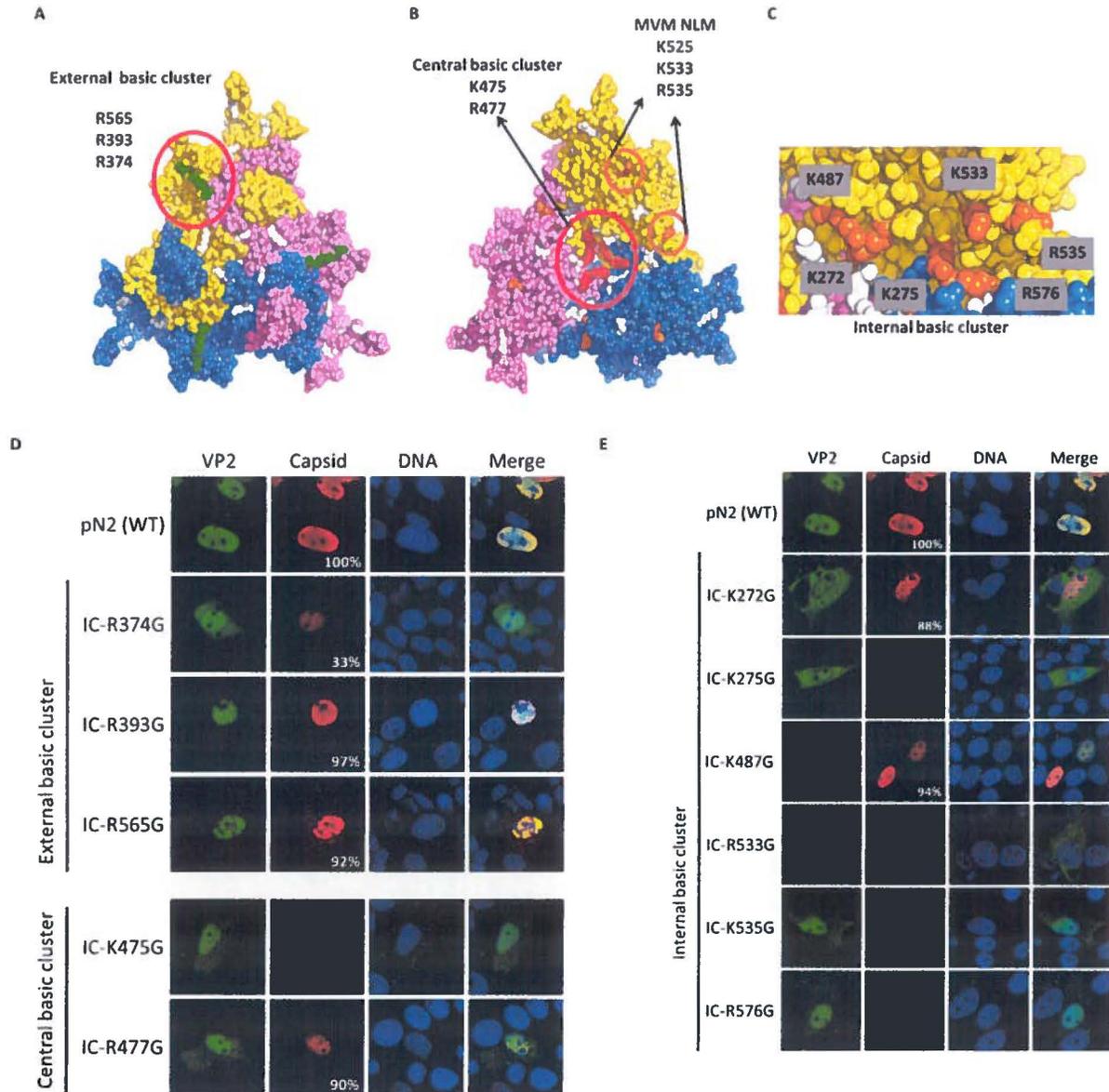


Figure 5. NLM identification for VP2 protein.

Three basic clusters were identified using the trimer structure information (PDB-ID 1K3V, with basic amino acids in white). (A) One external basic cluster is located outside of the capsid and includes three basic amino acids (green). (B) A central basic cluster is located inside the capsid at the center of the trimer and includes two basic amino acids for each protein (6 amino acids total, red). The image also shows basic amino acids in the beta-sheet corresponding to MVM NLM (orange). (C) Another internal cluster is located inside the capsid and is partly conserved with the NLM of MVM and includes six basic amino acids (orange). Basic amino acids were replaced by glycine in the infectious clone of PPV (IC). VP2 localization and capsid formation were investigated in transfection experiments. (D) Mutations in the external basic cluster or central basic cluster did not significantly change global VP2 localisation. (E) Mutation of some of the basic amino acids of the internal cluster resulted in a VP2 located either in a diffuse pattern between the nucleus and the cytoplasm or mostly in the cytoplasm. All images are representative fields for each clone, from at least three transfections. For each clone at least 300 positive cells were analysed. The percentage of cells with capsid formation is also indicated.

Site-directed mutagenesis was used to replace basic amino acids of potential NLM to glycine, to ensure flexibility. After mutagenesis, these mutants were cloned directly into the infectious clone, containing or lacking both NLS mutations (BR1 and BR45) to prevent nuclear transport caused by VP1. Transfection experiments and confocal microscopy were used to localize VP2 and observe capsid formation for each mutant. Results shown in Fig. 5D, and 6A demonstrated that neither the external basic cluster nor the central basic cluster mutations efficiently prevented VP2 transport to the nucleus. In sharp contrast, two single mutations of the internal basic cluster were sufficient to prevent most of VP2 transport to the nucleus (K272G and K533G) and VP2 K275G was present equally in the cytoplasm and nucleus (Fig. 5E and 6B). Since VP1 NLS could be responsible for some VP2 transport in the nucleus, by their association in trimer, infectious clones were created containing both the NLM and NLS mutations (BR145). Results showed no major difference in VP2 localization with or without the NLS of VP1 being present (Fig. 6).

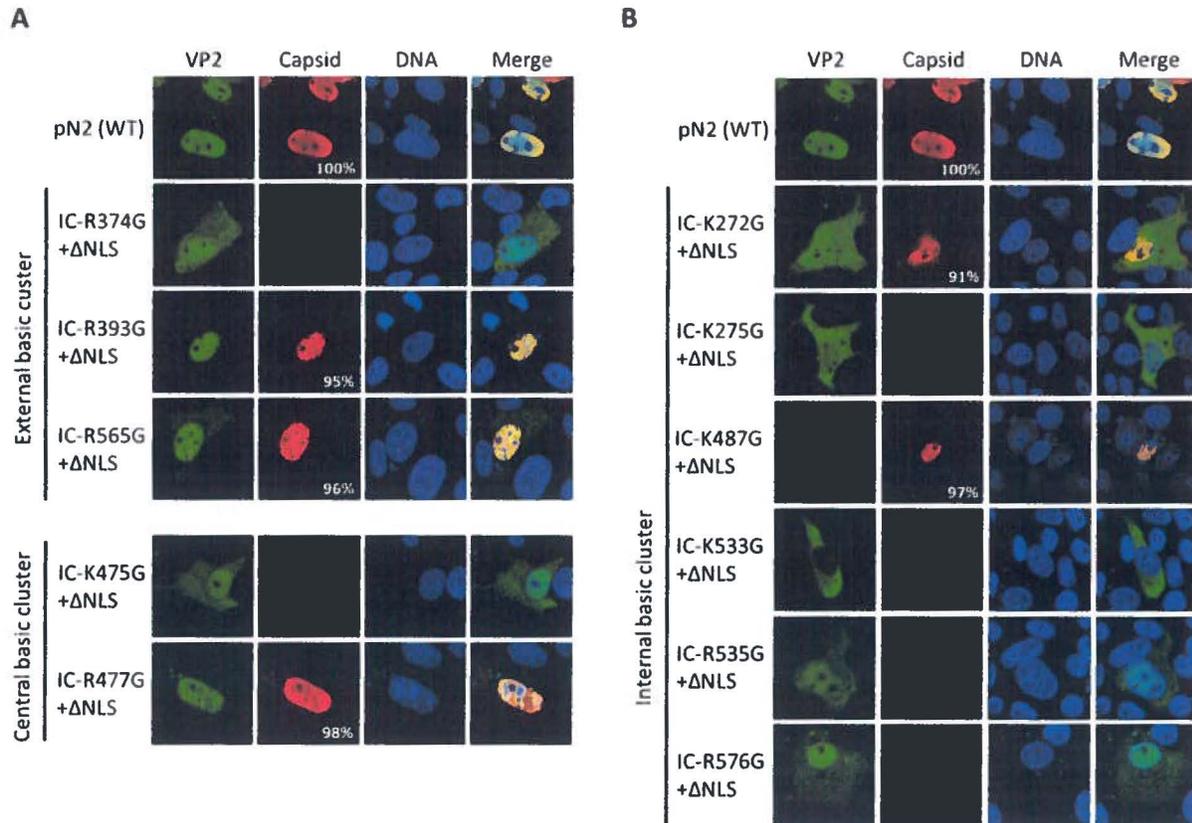


Figure 6. NLS and NLM mutation combinations.

Infectious clones containing each NLM mutations together with the mutation of BR145 were transfected in porcine PT cells. Immunofluorescence experiments at 30 h post transfection showed that the localization of VP2 was not significantly different from the mutants containing only the NLM mutations (Fig. 5). VP2 distribution was slightly more diffused or more cytoplasmic for some mutants. External and central basic clusters were not implicated in the efficient VP2 transport to the nucleus (A), but several single amino acid mutations of the internal basic cluster resulted in a deficient VP2 nuclear transport (B). All images are representative fields for each clone, from at least three representative transfections. For each clone at least 300 positive cells were analysed. The percentage of cells with capsid formation is also indicated.

For the mutants with nuclear localisation of VP2 and capsid formation, infectious virus production after transfection was assessed with the transfection supernatants (Fig. 7A). Despite relatively poor VP2 transport to the nucleus, viral amplification for mutants IC-K272G was comparable to the wt infectious clone. Mutant IC-R477G also produced high amount of infectious particles. In contrast, there was no infectious virus production for mutant IC-R374G; IC-R393G; IC-R565G and IC-K487G. Fitness experiments were performed with replicative infectious clones as explained for VP1up mutants. Fig. 7B-D showed that both mutant K272G and R477G produced less infectious virus, but the global fitness of the viruses was only statistically different for mutant K272G, for which

nuclear transport of VP2 trimers was impaired. This result suggested that mutation of a single amino acid (K272) from the NLM was not sufficient to completely block VP2 transport to the nucleus. It also suggests that virus production is efficient as soon as there is some VP2 in the nucleus. The location of R477G at the 5-fold axis probably impaired genome packaging and consequently produce fewer infectious particles.

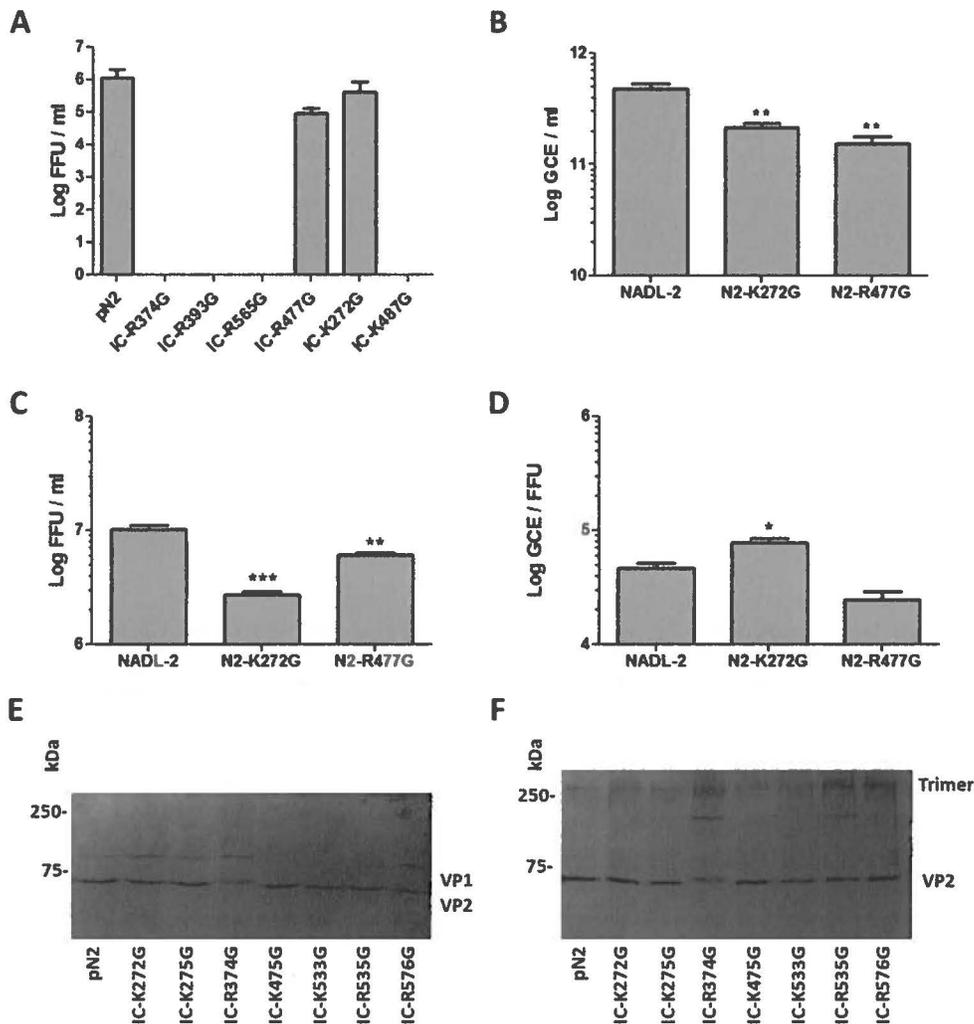


Figure 7. Viral amplification of NLM mutants.

The ability to produce infectious virus was investigated for mutants with capsid assembly. (A) Only two mutants produced infectious viruses: K272G and R477G. Fitness experiments were performed for those mutants. Infection of cells with an MOI of 1 resulted in less viral DNA amplification for both mutants (B), and less infectious virus was released from the cells 24 h p.i. (C). (D) Mutant K272G displayed a statistically lower global fitness, having a higher GCE/FFU ratio (* p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001). Trimer formation was investigated for mutants that could not efficiently assemble into capsids. Cos-7 cells were transfected with the infectious clones containing mutations that prevented nuclear localization or capsid formation. 30 h p.tr, cell lysate was either directly used for Western blot (E) or protein were crosslinked with DMS before lysis and Western blot (F) enabling identification of trimer formation.

Mutant IC-R374G assembled into capsids in only 30% of transfected cells, suggesting assembly problems may have prevented viral amplification. Mutants IC-R393G and IC-R565G were also not infectious, and their localization on the exterior of the capsid suggested that viral binding to the cell could be affected for those mutants. Using transfection supernatants of these clones, the amount of viral DNA before and after incubation with fresh cells for 2 h was compared by qPCR. There was no difference in the binding/entry of wt virus compared to mutants R393G and R565G, suggesting that the defect is not at this step of infection (data not shown). Mutants IC-K275G, IC-K533G and IC-R535G were not able to assemble into capsid, suggesting either assembly problems or too few VP2 trimers in the nucleus (Lombardo *et al.*, 2000).

Evaluation of VP2 trimer formation

Trimer formation is essential for nuclear transport of VP2 proteins. Protein association into trimers was investigated for mutants in which VP2 transport to the nucleus was prevented and for mutants with poor or no capsid formation. Transfection of porcine cells was not efficient enough to get significant signal in Western blot experiments. It was recently shown that transfection of non-permissive cells was an efficient system to produce parvoviral proteins. Some non-permissive cells, including Cos-7 cells, transfected with the infectious clone of canine minute virus, were efficient to amplify viral DNA and produced infectious virus (F. Li *et al.*, 2014). Transfection of Cos-7 cells with the infectious clone of PPV also enabled production of viral protein and production of infectious virus in the supernatant (data not shown). Those cells were transfected much more efficiently than the porcine cells and could produce enough VP proteins to investigate trimer formation (Fig. 7E). Protein crosslinking before cell lysis showed that all mutant could associate in trimers as the wt VP proteins (Fig. 7F, top bands). Two mutants also showed an intermediate band that could represent dimer or misformed trimer (IC-R374G and IC-R535C). This result suggested that for most of NLM mutations, nuclear transport impairment was not due to the absence of trimer formation.

DISCUSSION

Identification of active NLS in VP1up

Several parvoviruses are known to contain active NLS in the unique region of VP1 (Lombardo *et al.*, 2002, Vihinen-Ranta *et al.*, 1997). Sequence analysis of PPV VP1up revealed five potential NLS. Mutagenesis experiments with fluorescent fusion proteins showed that BR1 was an active classic Pat7 NLS and that the combination BR4-BR5 was an active classic bipartite NLS (Fig. 3). Moreover those NLS were essential to complete PPV infectious cycle (Fig. 4). These results showed that PPV minor capsid protein contained one more active NLS than VP1up of the closely related parvoviruses MVM and CPV (Lombardo *et al.*, 2002, Vihinen-Ranta *et al.*, 1997). Transfection of different mutant fusion protein always resulted in some cells where the protein was present in both the cytoplasm and the nucleus (Fig. 3A-D). The proportion of cells with diffuse protein was less important for the mutants of all basic regions compared to mutant BR145, suggesting that BR23 may provide a weak NLS activity. A small nuclear accumulation of EGFP-BR3 and EGFP-BR23 (Fig. 3E) was also observed, supporting this supposition. However, these basic regions were not essential or sufficient for proper nuclear transport of VP1up. Finally, it is possible that a subset of the small proportion of cells with diffused protein is caused by cellular division after protein expression and before cell fixation, leading to some protein to be included in the newly formed nucleus.

VP1up NLSs were located in the flexible N-terminal part of VP1, which becomes externalized in the endosomal pathway. Their location suggested that they can be used either to transport the capsid to the nucleus in the early steps of infection or to transport newly synthesized trimers at the late steps of infection. However, since VP1 is the minor protein, the NLM was expected to be the major determinant for the nuclear targeting of the trimers in late infection. Moreover, since the NLM identified for PPV (Fig. 5) is located inside assembled capsids, the two active NLS of VP1up are the only exposed nuclear targeting sequences in early steps of infection. Our experiments showed that

transfection of an infectious clone containing the mutated BR1, BR4 and BR5 resulted in the formation of complete capsids (Fig. 4). Those capsids were unable to complete the infectious cycle after infection of fresh cells using virus from the transfection supernatants, strongly suggesting that the NLS are important to target the capsid to the nucleus in the early phase of infection.

Identification of a complex motif responsible for VP2 nuclear transport

The linear VP2 sequence does not contain regions with more than two basic amino acids in close proximity, which could be potential classic NLS. However, as much as 40% of cellular nuclear protein sequences do not contain such classic NLS (Lange *et al.*, 2007). Some non-classic NLS were identified in the literature, and others remain to be found. In our hypothesis, VP2 folding and assembly into trimers was necessary to form a motif containing enough basic amino acids to be recognized and transported by the cellular import machinery. It was shown that MVM VP2 nuclear import depends on a beta-sheet containing five basic amino acids in close proximity in the tertiary structure of the protein after correct protein folding (Lombardo *et al.*, 2000). This region is also well conserved in canine parvovirus major capsid protein, but not in VP2 from PPV. However, structural analysis of basic amino acids in that region showed that basics residues outside of the beta-sheet were also in close proximity in the correctly folded trimer. Two basic amino acids conserved with MVM NLM (K533 and R535) were also close to K272, K275, K487 and R576 in PPV trimers (Fig. 5). Mutagenesis of single amino acids from that region was enough to prevent efficient VP2 nuclear localization (K272G, K275G and K533G), strongly suggesting that this region was the NLM for PPV VP2, responsible for transport of trimers to the nucleus. Since most trimers do not contain VP1 and its NLS, the NLM is essential for trimers containing only VP2, and these trimers are essential for proper capsid assembly (Lombardo *et al.*, 2002), thus this NLM is essential for PPV infection. Combination of two amino acid mutations resulted in localization patterns similar to single mutations (data not shown). Further mutations were expected to result in protein assembly difficulties and were not attempted.

Interestingly, the localization of VP2 mutants was much more constant from cell to cell compared to VP1 mutants. The representative immunofluorescence images in Fig. 5 correspond to VP2 localization patterns that were observed in most transfected cells (> 80%), and it was therefore unnecessary to evaluate the localization in percentages of cells as for VP1up (Fig. 3). It is possible that the fusion of VP1 with mCherry resulted in a protein for which folding was not stable or consistent, resulting in some cells displaying more or less accessible NLS.

The transfection experiments also showed that capsid formation was sensitive to single amino acid mutations. Indeed several mutants accumulated high concentrations of VP2 in the nucleus, but without capsid assembly (IC-K475G; IC-K275G; IC-R535G; IC-R576G). Several possibilities can explain this observation. First, it was shown for MVM that nuclear import solely by the NLS of VP1up results in aggregate formations without capsids, suggesting that the ratio of VP2 to VP1 protein is important and that an excess of VP1 can prevent proper capsid assembly (Lombardo *et al.*, 2000). This is the most likely explanation for IC-K533G clone with particularly low accumulation of VP2 in the nucleus. It is also possible that some mutations caused distortions of the trimers, preventing strong contacts required for capsid assembly or antibody recognition in IF experiments. Also analysis of several single amino acid mutations at 22 VP2 amino acid positions, conserved among the *Parvovirinae* subfamily, all but three (T170A, T258A, G259A) prevented capsid formation, supporting our hypothesis that capsid formation is sensitive to mutations (E Akl and P. Tijssen, unpublished observations).

Trimer association for parvovirus capsid protein is believed to be spontaneous and involve multiple strong contacts between the proteins. It was demonstrated for MVM that trimer association and transport to the nucleus could not be prevented by single amino acid mutations (Perez *et al.*, 2011). The amino acids chosen in that study were those displaying strong intratrimeric interactions. In the present work, several single amino acids mutation of the identified NLM prevented nuclear accumulation of the protein. However, protein crosslinking experiments showed that most mutants could

associate in trimer as efficiently as wt proteins. The only mutants with different protein migration patterns were IC-R374G and IC-R535G. These mutants showed the same trimeric band as the other mutants and wt clone, but also a band with lower molecular mass that could represent a dimer or malformed trimer. This experiment demonstrated that mutants IC-K272G, IC-K275G and IC-K533G could assemble into trimer but these trimers were incompetent for nuclear transport. This supports our hypothesis that this region is the NLM for PPV VP proteins.

There was a subset of mutants for which capsid formation was successful, but viral amplification failed: IC-R374G, IC-R393G, IC-R565G and IC-K487G. Our initial hypothesis for the mutations located outside the capsid was that virus binding could be impaired such that these viruses could not enter cells. However, a qPCR experiment showed that these mutants could enter cells as well as the wt virus. Since macropinocytosis is an important entry mode for PPV (Boisvert *et al.*, 2010), and that this entry mode does not require specific receptor binding, it is possible that uptake of the mutants was mostly achieved by that mechanism. It is also possible that mutations located on the outer surface of the capsid prevented other interactions with cellular proteins, proper capsid disassembly or genome delivery to the nucleus. A more efficient system for transfection and production of mutant virus will be required to increase the production of mutant virus to pursue the analysis of non-replicative mutants.

In summary, we demonstrated that capsid protein targeting to the nucleus for porcine parvovirus depended on both classic nuclear localization signals and a novel structural motif, requiring proper folding of structural proteins and assembly into trimers. PPV was also shown to be different from the other closely-related protoparvoviruses CPV and MVM, containing one more active NLS, and a more complex NLM, including basic residues outside of the beta-sheet. Structural motifs like the one described here are likely to be responsible for nuclear transport of other proteins, both viral and cellular, for which no classic NLS were identified by bioinformatics pattern recognition software.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was funded by a grant from the Natural Sciences and Engineering Council of Canada (NSERC) to P.T., NSERC scholarship to M.B. and Fondation Armand-Frappier for scholarships to M.B., V.B.-L. and S.F..

The authors wish to thank Jessy Tremblay for technical support with the confocal microscopy imaging, Angela Pearson for the mCherry plasmid and Jean-François Laliberté for EGFP plasmid.

CHAPITRE 4 : TROISIÈME ARTICLE

Differential replication of two porcine parvovirus strains in bovine cell lines ensues from initial DNA processing and NS1 expression

Journal of General Virology. 2014. Apr;95(Pt 4):910-21

Sandra Fernandes^{‡†}, **Maude Boisvert[‡]**, Jozsef Szelei and Peter Tijssen*

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

[‡] These authors contributed equally to this work

[†] Current address:

SUNY Upstate Medical University, 750 E. Adams Street, 2204 Weiskotten Hall, Syracuse, NY 13210

Résumé de la publication

Titre : La réplication différentielle de deux souches du parvovirus porcin dans les cellules bovines dépend du traitement initial de l'ADN et de l'expression de NS1

Le parvovirus porcin (PPV) est un petit virus avec un génome d'ADN caractérisé par une capacité codante limitée. Le génome de 5 kb exprime trois protéines non structurales majeures (NS1, NS2, SAT) et deux protéines structurales (VP1 et VP2). Ces quelques protéines virales sont pléiotropiques et interagissent avec des composantes cellulaires tout au long de la réplication virale. À cet égard, très peu de lignées cellulaires sont capables de répliquer le virus. Des lignées cellulaires bovines ont été établies à partir d'une lignée primaire qui a permis de distinguer des variants allotropiques du PPV. Trois lignées ont été sélectionnées et avaient une sensibilité

différente à l'infection par les deux souches prototypes du PPV, NADL-2 et Kresse. Dans la première lignée cellulaire (D10), l'infection était restreinte tôt dans le cycle de réplication, et était non productive. L'infection de la seconde lignée cellulaire (G11) était 1000 fois moins efficace avec la souche NADL-2 comparativement aux cellules porcines et l'infection par la souche Kresse était tout juste détectable. Les restrictions dans cette lignée cellulaire se situaient lors de la génération des intermédiaires de réplication de l'ADN et lors de la production de la protéine NS1. L'utilisation de virus chimères entre les deux souches a montré que des résidus en dehors du déterminant allotropique précédemment identifié étaient impliqués dans la restriction. La lignée cellulaire F4 était permissive aux deux souches virales, bien que la production de particules infectieuses fût limitée par rapport aux cellules porcines. Ces résultats ont mis en évidence la nature dépendante du tropisme des parvovirus sur les facteurs cellulaires et suggèrent que des cellules ne provenant pas de l'hôte original peuvent montrer une réplication productive avec les deux souches virales.

Contribution des auteurs

Le projet a été élaboré principalement par Sandra Fernandes, Maude Boisvert et Peter Tijssen. Jozsef Szelei a effectué la sélection des lignées cellulaires bovines. Les manipulations pour le tableau 1 et les figures 1(a-c), 2, 4 et 5 ont été effectuées par Sandra Fernandes et les manipulations pour les figures 1(d,e), 3 et 6 ont été effectuées par Maude Boisvert. Le manuscrit a été rédigé par Sandra Fernandes et Maude Boisvert et révisé avec la participation de Peter Tijssen. **Les résultats liés aux objectifs de cette thèse sont ceux des figures 3 et 6 (NS1).**

Abstract

Porcine parvovirus (PPV) is a small DNA virus with restricted coding capacity. The 5 kb genome expresses 3 major nonstructural proteins (NS1, NS2, SAT), and 2 structural proteins (VP1, VP2). These few viral proteins are pleiotropic and interact with cellular components throughout viral replication. In this regard, very few cell lines were shown to efficiently replicate the virus. Cell lines were established from a primary culture of bovine cells that allowed distinguishing allotropic variants of PPV. Three cell lines were differentially sensitive to infection by two prototype PPV strains, NADL-2 and Kresse. In the first cell line (D10), infection was restricted early in the infectious cycle and was not productive. Infection of the second cell line (G11) was 1000 times less efficient with the NADL-2 strain compared to porcine cells while production of infectious virus of the Kresse strain was barely detectable. Restriction points in those cells were the initial generation of DNA replication intermediate and NS1 production. Infection with chimeras between NADL-2 and Kresse showed that residues outside the previously described allotropic determinant are also partially responsible for the restriction to Kresse replication in G11 cells. F4 cells were permissive to both strains although genome replication and infectious virus production were lower than in the porcine cells used for comparison. These results highlighted the dependent nature of parvovirus tropism on host factors and suggested that cells from a non-host origin can fully support a productive infection by both strains.

Introduction

Porcine Parvovirus (PPV), of the Parvovirinae subfamily of the Parvoviridae family has a non-enveloped, icosahedral capsid of 25 nm in diameter (Simpson et al., 2002) and contains a nonsegmented single-stranded, linear 5kb DNA genome. PPV and other members of the Parvovirus genus are autonomous and most package only the negative DNA strand. Their genome is characterized by distinct terminal palindromic

sequences and two main gene cassettes, for nonstructural (NS) and structural proteins (VP) (Tattersall, 2006).

Replication of parvoviruses occurs mainly in the nucleus and is initiated by conversion of incoming single-stranded genome to a monomeric replication form (double-stranded mRF) during early S phase, and requires cellular DNA polymerase δ and its associated factors (Bashir et al., 2000, Christensen et al., 2002). The virus itself cannot induce the S phase, and thus requires actively dividing cells for its replication. Transcription of this dsDNA allows generation of NS1 protein, which in turn enables genome amplification (Rhode, 1989) and trans-activation of the VP promoter (Rhode, 1985b). Further genome replication proceeds by a rolling-circle mechanism (Tattersall *et al.*, 1976) by creating genome concatemers of varying lengths, including dimeric replicative forms (dRF) from which the single-stranded genomes are excised and packaged into pre-formed capsids (Cotmore *et al.*, 2005a). Alternative splicing directs synthesis of capsid proteins VP1 and its smaller version VP2, (Bergeron et al., 1993, Mani et al., 2006, Weichert et al., 1998). The unique N-terminal extension of VP1 (150 amino acids) contains phospholipase A2 (PLA2) activity (Zadori et al., 2001) which is necessary for endosomal pathway escape (Farr et al., 2005). Newly synthesized VP proteins are transported as trimers to the nucleus where further capsid assembly and DNA packaging takes place (Lombardo et al., 2000). Finally, full virions are exported from the nucleus in a process involving NS2 (Eichwald et al., 2002, Engelsma et al., 2008, Miller et al., 2002) while the rest of the virus is released following cell lysis induced by cytotoxic activities of the NS proteins (Anouja et al., 1997, Nuesch et al., 2009, Nuesch et al., 2006).

PPV causes reproductive failure in swine (Rodeffer et al., 1975) and is still a significant burden when vaccination programs are not rigorously followed. Indeed, current vaccines fail to trigger long-term protective immunity in sows, and vaccination must be repeated every 4-6 months (Jozwik et al., 2009). Virus replication and shedding still occurs in sows where vaccination efficiently prevented reproductive failure (Jozwik et al., 2009). Constant virus replication in herds facilitates the emergence of new

strains, some of which are not effectively neutralized by serum obtained after vaccination (Zeeuw et al., 2007). This could lead to emergence of new virulent strains resulting in reproduction failure despite regular vaccination (Streck et al., 2011).

Little is known about mechanisms that control PPV tropism both in vivo and in vitro. Studies have shown that tropism is primarily determined at the cell surface for other members of the Parvovirus genus. The host-range evolution of the feline to canine parvovirus strains (FPV and CPV) involved interaction between the viral capsid and the transferrin receptor type 1 (TfR) (Hoelzer et al., 2010, Hoelzer et al., 2008, Truyen et al., 1995). For MVM, capsid residues were shown to be partially responsible for the phenotypes of the fibrotropic (prototypic) or lymphotropic strains, although they did not involve attachment to the cell surface (Ball-Goodrich et al., 1992, Gardiner et al., 1988). Depending on the cell type, restrictions have been identified at delivery of the incoming genome to the nucleus (Previsani et al., 1997), activation of the early promoter (Deleu et al., 1999) and genome replication and post-encapsidation steps (Rubio et al., 2001). For PPV, infection of Madin-Darby canine kidney cells (MDCK) demonstrated that cellular association of PPV was strong and specific with both swine testis cells (ST) and MDCK cells. However, viral genome replication and transcription are factors limiting permissivity in the canine cells (Oraveerakul et al., 1992). Others identified a variant of the non-pathogenic attenuated NADL-2 vaccine strain, designated P2, which had gained the ability to replicate in canine cells after only 2 amino acid substitutions: one in the NS gene and one in the capsid gene (Vasudevacharya et al., 1992).

Our previous studies demonstrated that a primary bovine testis cell culture (TV cells) was only sensitive to the NADL-2 vaccine strain of PPV, while infection with the highly pathogenic Kresse strain, was non-productive (Bergeron et al., 1996). These strains differ by only 13 nucleotides, 6 of which alter the VP protein sequence, and by a 127-nucleotide repeated sequence downstream of the VP gene cassette in the NADL-2 strain. Furthermore, the allotropic determinant restricting Kresse replication in TV cells was found to consist mainly of a short BglIII restriction fragment encoding three of the

non-synonymous substitutions between the strains (Bergeron et al., 1996). To extend analysis of mechanisms involved in this differential tropism, cell lines were established from primary TV cells. 13 cell lines were obtained and their ability to support PPV replication was determined. We observed three categories of cells: cells that could replicate viruses of both strains, cells that could replicate only NADL-2 efficiently and cells that could not replicate either strain. Three bovine cell lines, D10, G11, and F4, were chosen for further studies since they represented the full spectrum of observed phenotypes to viral infection. This report assesses multiple steps of PPV replication cycle in these bovine cell lines, and compares them to those in PT cells, a permissive porcine testis cell line.

Results

Sensitivity of the bovine cell lines to infection with NADL-2 and Kresse viruses

Initially, sensitivity to infection was assessed by scoring development of cytopathic effects (CPE) with both viral strains in different cell lines. Results in Table 1 represent CPE observed from duplicate wells at different times post-infection (p.i.) until mock infected cells reached confluency. For all results shown in this study, experiments were repeated at least three independent times. The F4 bovine cell line was almost as sensitive to both strains as the porcine (PT) cells. G11 bovine cell line was sensitive to NADL-2 while Kresse infection showed very limited effects. Finally the D10 cell line displayed almost no CPE regardless of the PPV strain. Infectious virus production in each cell line was monitored by subsequent titration of supernatants at different times p.i.. Residual background virus measured at 12 h p.i. was lower than the detection level in this assay (102 FFU ml⁻¹). Following infection with the NADL-2 strain (Fig. 1a), high, intermediate and a 3 log lower virus production was observed in the PT cells, F4 cells, and G11 cells, respectively, while D10 cells consistently failed to produce infectious virus. Virus production was 1 log lower in porcine cells when infected with the Kresse strain (Fig. 1b) compared to the NADL-2 strain, F4 cells produced almost equivalent

amounts of infectious virus from either strain, and G11 cells produced only a very limited amount of infectious Kresse virus. No infectious particles were detected after infection of D10 cells.

Table 1 : CPE caused by PPV NADL-2 or Kresse strains

NADL-2												
MOI	PT cells			F4 cells			G11 cells			D10 cells		
	24h	48 h	72 h	24h	48 h	72 h	24h	48 h	72 h	24h	48 h	72 h
0.001	-	-	++++	-	-	+	-	-	-	-	-	-
0.01	-	++++	++++	-	-	++	-	-	+	-	-	-
0.1	-	++++	++++	-	++	+++	-	+	+	-	-	-
1	+	++++	++++	-	++++	++++	-	+	+++	-	-	+
10	++++	++++	++++	+	++++	++++	-	++	+++	-	-	+

Kresse												
MOI	PT cells			F4 cells			G11 cells			D10 cells		
	24h	48 h	72 h	24h	48 h	72 h	24h	48 h	72 h	24h	48 h	72 h
0.001	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.01	-	+	++	-	-	++	-	-	-	-	-	-
0.1	-	++	+++	-	++	+++	-	-	-	-	-	-
1	-	+++	++++	-	++++	++++	-	-	-	-	-	-
10	-	++++	++++	-	++++	++++	-	+	+	-	-	+

- : less than 10 % CPE, + : 10-40% CPE, ++ :40-60% CPE, +++ :60-80 % CPE , +++++ : more than 80 % CPE.

Since parvoviruses require actively dividing cells for their replication (Tattersall, 1972), cell-cycle progression through S phase was monitored in the bovine cell lines. All cell lines grew efficiently (Fig. 1c), with about 40% of cells in S phase at any time point and nearly 80% of the cells having passed the S-phase within 24 h. Thus, low virus replication observed in the bovine cell lines was not due to the cells being in a resting or growth-arrested state. Finally, cellular binding and uptake of both viral strains by the cell lines was monitored by qPCR after 2 h of infection. We previously demonstrated that no significant amount of virus binds to the plates, and thus DNA detection corresponded only to bound and internalized virus (Boisvert et al., 2010). Results are shown in Fig. 1(d), (NADL-2) and Fig. 1(e) (Kresse); all cell lines captured viruses of both strains at comparable levels. Generally, no major restriction level was found in the replication of

either strain in the F4 cell line. Moreover, replication was restricted at very early steps in D10 cells (no detectable viral DNA processing, data not shown), for both strains. We thus decided to focus on G11 cells, displaying interesting features, allowing lower but detectable replication compared to porcine cells, and displaying significant differences between the NADL-2 and Kresse strains.

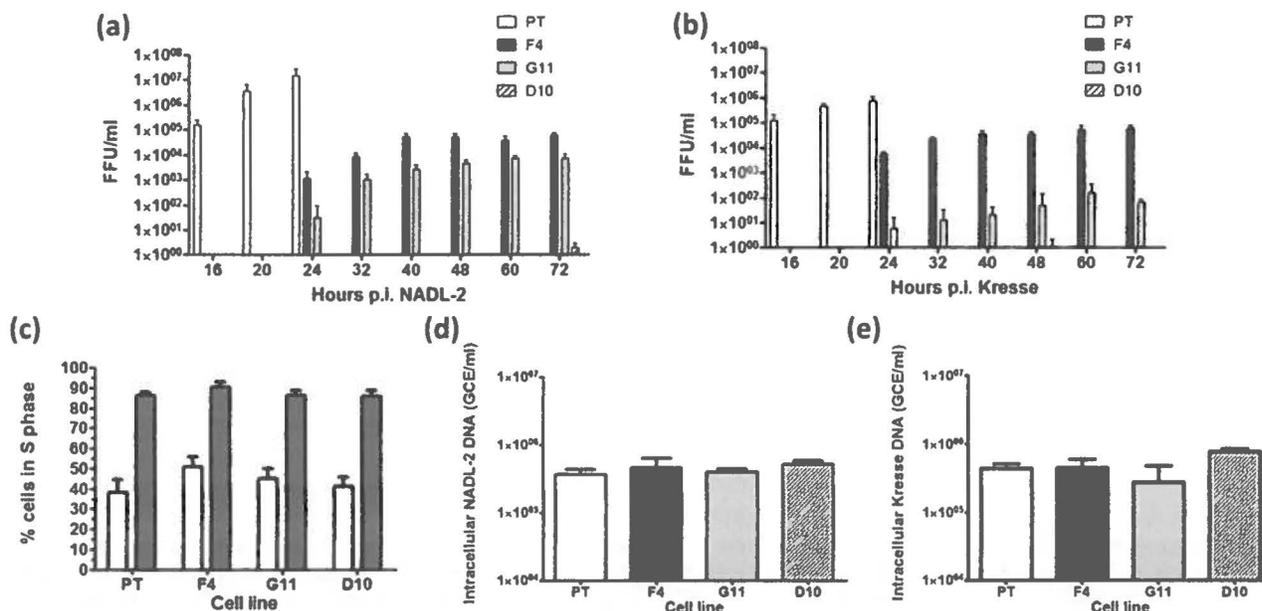


Figure 1. Cell lines sensibility to PPV infection.

Viral titers in supernatants at different times p.i. with NADL-2 (a) and Kresse (b) expressed in (Mean + SD) FFU ml⁻¹ from duplicate wells (in PT cells only for first 24 hrs because of rapid CPE). (c) Cell lines transit through S phase as measured by EdU incorporation. Results are expressed as % of cells in S phase, relative to total cell number (Hoechst staining) from triplicate wells (white bars in S-phase (1 h pulse labeling) and grey bars cells having passed through S-phase (24 h labeling)). (d-e) Viral uptake of bovine (F4, G11, D10) and porcine (PT) cell lines after infection by both PPV strains (NADL-2 (d) and Kresse (e)) scored by qPCR. Results are expressed in genome copy equivalent (GCE) ml⁻¹, from triplicate samples. All results are representative of at least three independent experiments.

Generation of genomic replication intermediates

Conversion of incoming single-stranded parvovirus genomes to double-stranded DNA (mRF) is a primordial step in the replication cycle, as it precedes viral transcription and depends entirely on cellular factors (Bashir et al., 2000, Cossons et al., 1996). Synthesis of different viral genome replicative forms was monitored in infected cells by Southern blotting. As shown in Fig. 2, high levels of mRF were observed in PT cells

regardless of PPV strain. In G11 bovine cells, significantly reduced amounts of mRF were observed, suggesting either lower genome delivery to the nucleus (no detection of incoming DNA at 8 h p.i.) or poor association with cellular factors required to initiate DNA processing. These results reflected the low percentage of cells with virus replication, as seen by the NS1 immunofluorescence (Fig. 3e) and total viral DNA detection by qPCR (Fig. 4). The dRF, generated by the “rolling hairpin replication” of parvoviruses, was below detection level in G11 cells most likely due to the lower amount of DNA processing.

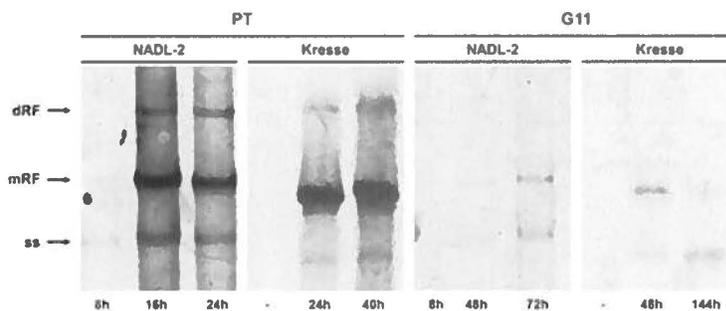


Figure 2. Synthesis of viral genome replication intermediate. Southern blotting after infection of porcine (PT) and bovine (G11) cells, with either viral strain at indicated times p.i showed three viral genomic forms. Results are representative of at least 3 independent experiments. ss: single-stranded genome, mRF: monomer replicative form (transcription template), dRF: dimer replicative form.

NS1 production and localization

Generation of the mRF allows production of multifunctional NS1 viral protein. NS1 production and localization was thus monitored by immunofluorescence and confocal microscopy. Infection with the Kresse strain led to a delayed production of NS1. At 12 h p.i. with NADL-2 in PT cells (Fig. 3a), NS1 protein was clearly distinguishable throughout the nucleus, while staining was strong only in small regions and very weak in the rest of the nucleus when cells were infected with Kresse. At 16 h p.i. the intensity of the NS1 staining pattern in Kresse-infected cells matched levels observed at 12 h p.i. with NADL-2. At all time points, NS1 staining was brighter and in greater proportions of the nucleus in cells infected with NADL-2 compared to Kresse. In

G11 cells, very few cells were positive for NS1, and the staining patterns were observed at later time points compared to porcine cells (Fig. 3b).

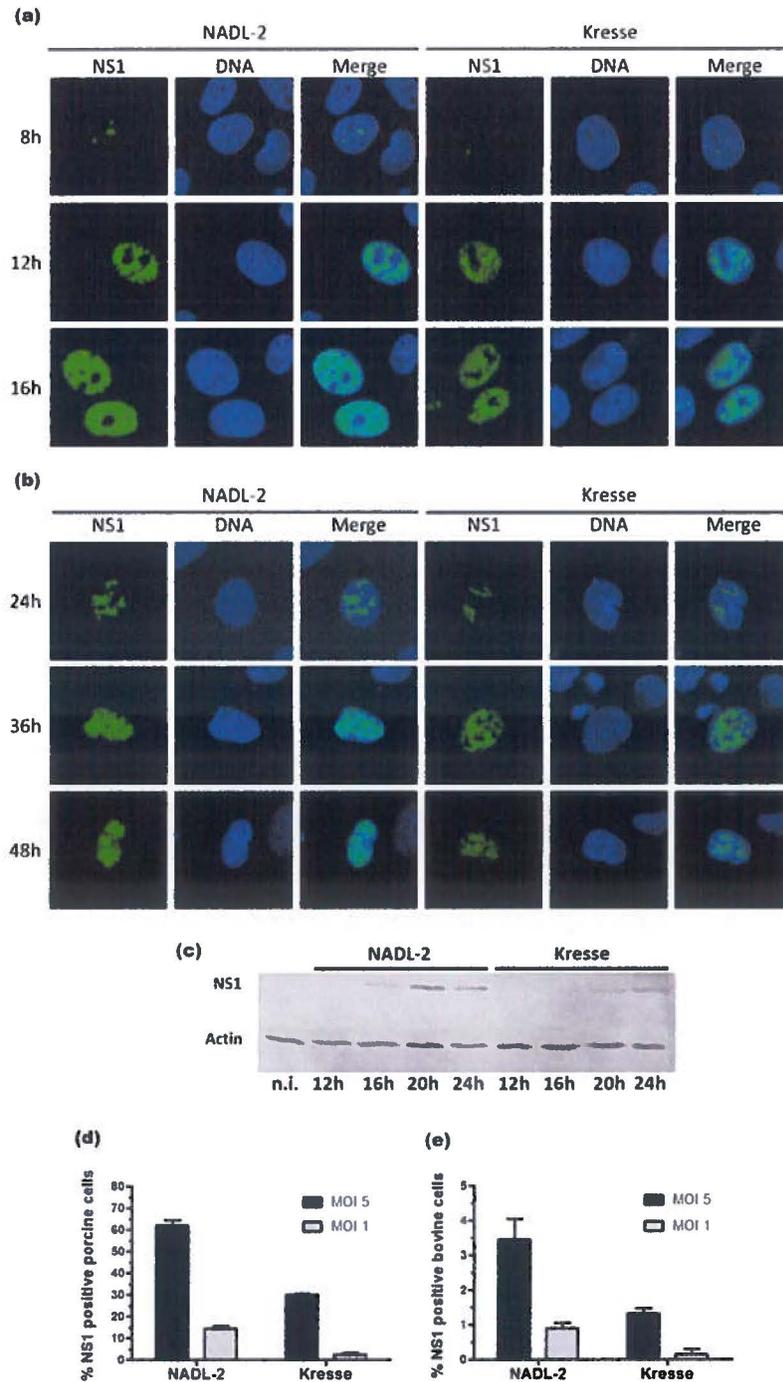


Figure 3. NS1 production.

Kinetics of NS1 production and accumulation in the nucleus of porcine (PT) and bovine (G11) cells (a,b respectively). Cell were infected with either NADL-2 and Kresse strain with an MOI of 5 and fixed at indicated times p.i. immunofluorescence was performed using monoclonal anti-NS1 and Alexa-488 secondary antibody and imaging was done by confocal microscopy. (c) Cell lysates from PT-infected cells were harvested at indicated times p.i. with either strain and Western blots were performed using monoclonal anti-NS1 and anti-

actin as a loading control. Percentage of NS1-positive PT (d) and G11 (e) cells after infection with either strain at an MOI of 5 for 24 h (PT cells) or 48 h (G11 cells). Cells were analysed by immunofluorescence performed as in (a). Results in (d) and (e) were mean + SD of at least 300 analysed cells in triplicate, and all are representative of at least 3 independent experiments (a-e).

Differences in staining intensity were also observed in G11 cells when comparing NADL-2 and Kresse, i.e. at the same time p.i., NS1 was detected in a greater part of the nucleus with greater intensity when cells were infected with NADL-2 compared to Kresse. The delay in NS1 accumulation in PT cells infected with Kresse strain was corroborated in western blot experiment (Fig. 3c). Again, infection of porcine cells with NADL-2 resulted in an earlier accumulation of NS1, and at higher levels, compared to infection with Kresse. This comparison was not feasible for G11 bovine cells, because amounts of NS1 were below detection.

Differences in numbers of cells expressing NS1 were observed when comparing NADL-2 and Kresse infections, and, more importantly, very few G11 bovine cells were positive for the NS1 protein. In porcine cells (Fig. 3d), the proportion of NS1 expressing cells was nearly double in NADL-2 infected cells (60 %) as compared to Kresse-infected cells (30 %) at an MOI of 5. In G11 bovine cells, these percentages dropped significantly (less than 5%), and again, more cells were NS1-positive when infected with NADL-2 compared to Kresse (Fig. 3e). Expression of NS1 viral protein was thus an important difference in NADL-2 versus Kresse infection in both cells, and substantially restricted in G11 bovine cells.

Virus genome replication

Quantitative analysis of PPV genome amplification of PPV genomes in the porcine and bovine cells was performed by qPCR. Genome replication in PT cells was readily detected from 10 h p.i. and reached a peak at 20 h p.i. (Fig. 4). In these cells, newly produced virus was already present in the supernatant at 16 h p.i., and thus DNA replication was not monitored after 24 h to avoid detection from the second round of replication. Kresse genome replication was detected later (12 h vs. 10 h) and reached similar levels as NADL-2 at 16 h p.i.. Genome replication from the NADL-2 strain in G11

bovine cells was delayed compared to PT cells, as it started at 16-20 h and reached a peak only at 40 h p.i.. Kresse genome replication in G11 was only slightly above detection limit after 48 hrs.

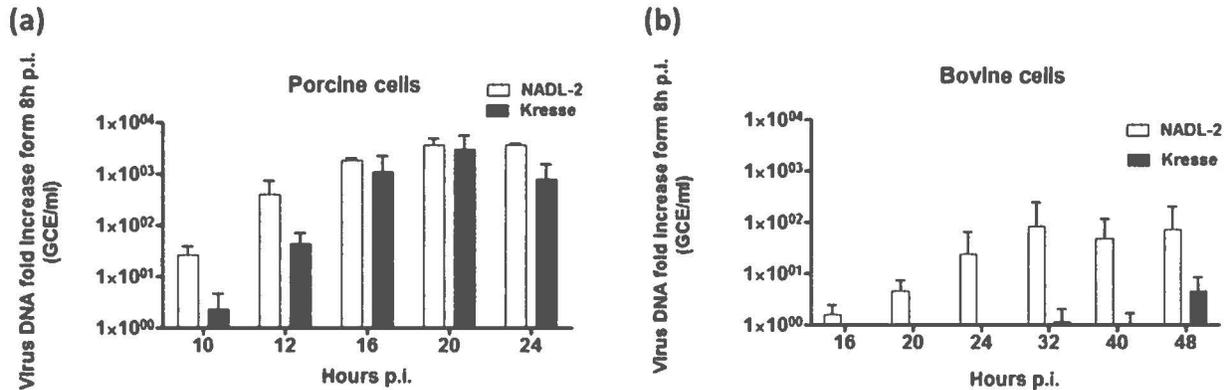


Figure 4. Viral DNA replication kinetics.

Increase in viral DNA at indicated times p.i. of porcine (a) and bovine (G11) (b) cells. Viral DNA was quantitatively measured by qPCR. Amplification was determined as relative to initial virus DNA measured at 8 h p.i. and normalized to cell numbers with *c-myc* DNA. Results are expressed in (Mean + SD) GCE ml⁻¹ from at least 3 independent experiments. (* p<0.05)

Capsid protein production

After their synthesis, capsid proteins are transported to the nucleus, where they are assembled into capsids before DNA packaging. Production and localization of capsid proteins was monitored by immunofluorescence and confocal microscopy at different times post infection with VP2- and capsid-specific antibodies. In porcine cells, almost all VP2 staining was located in the nucleus, together with capsid staining, suggesting a very efficient transport of capsid proteins to the nucleus. Few G11 cells displayed capsid proteins when infected with Kresse ($\leq 0.1\%$) compared to NADL-2 ($\leq 1\%$, data not shown). However, an interesting pattern was observed for NADL-2 infection. While 80% of infected G11 cells displayed a normal phenotype, a portion of NADL-2-infected cells displayed an alternate localization of the structural proteins. Co-localization of capsid and VP2 staining in the nucleus was weak, while cytoplasmic accumulation of capsids was evident (Fig. 5). This pattern was readily observable when infecting at low MOI, where entering virus could not be detected at earlier time points. It

was also not detectable when transcription was inhibited by treatment of cells with actinomycin D, and thus represented newly synthesised capsid (data not shown).

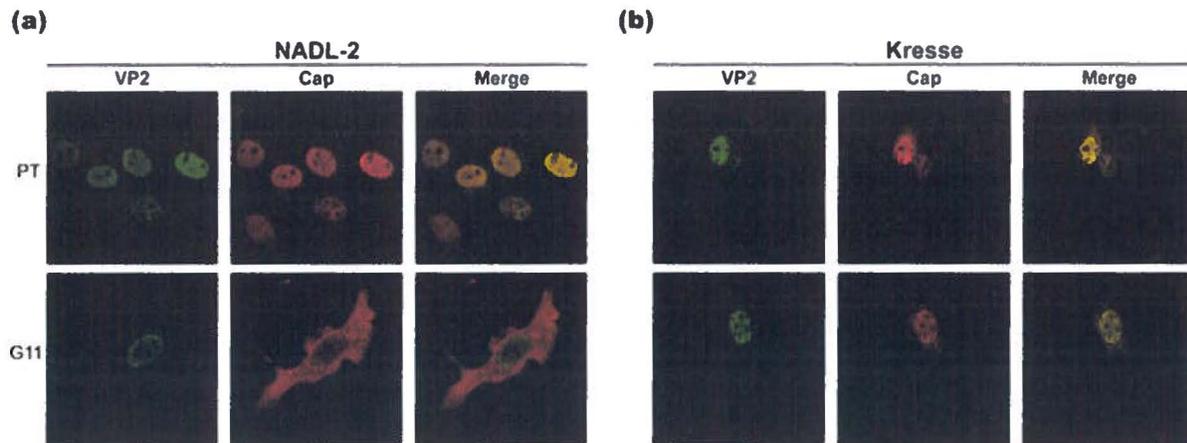


Figure 5. Capsid proteins production.

Cells infected with NADL-2 (a) or Kresse (b) were infected at an MOI of 5 and fixed at 20 h p.i. (PT) or 48 h (G11). Indirect immunofluorescence and confocal microscopy imaging was performed using an antibody to the N-terminal region of VP2 (with anti-rabbit Alexa488, left panels: VP2) to detect pre-capsid precursors and full capsids and with monoclonal antibody 3C9 (with anti-mouse Alexa568, center panels: Cap) to detect full and empty capsids. Perfect co-localization of VP2 and Cap staining (yellow) is indicative of full capsid (right panels: Merge).

Viral chimeras

Kresse replication was not productive in the parental primary TV bovine cells (Bergeron et al., 1996). A short genome fragment (the allotropic determinant) was responsible for the difference of replication between NADL-2 and Kresse strains in TV cells (Fig. 6a). Subsequently, only 2 of the 3 amino acid differences in the allotropic determinant were shown to be sufficient to restore Kresse replication in the TV cells (D378G, H383Q, data not shown). Thus, a chimera of Kresse containing the CR2 fragment from NADL-2, containing those two coding changes, was used (Fernandes et al., 2011) to determine whether the same determinant was responsible for poor Kresse replication in G11 cells. Results in Fig. 6(b) showed that while the K-CR2-N chimera produced more FFU in supernatants than Kresse, it failed to reach NADL-2 virus production levels. Since NS1 was also found to be an important difference between the two strains, production of this protein was evaluated using different chimeras of the strains. K-CR2/3-N chimera was the best in term of NS1 production in both cell lines (percentage of NS1 expressing cells, Fig. 6(c,d)), except for chimera K-CR1/2/3-N

which contains all NADL-2 coding regions and the non-coding region of Kresse. K-CR2/3-N was also the best chimera, in terms of infectious virus production (expressed in FFU) in G11 cells (Fig. 6e) as observed before with the porcine cells (Fernandes et al., 2011).

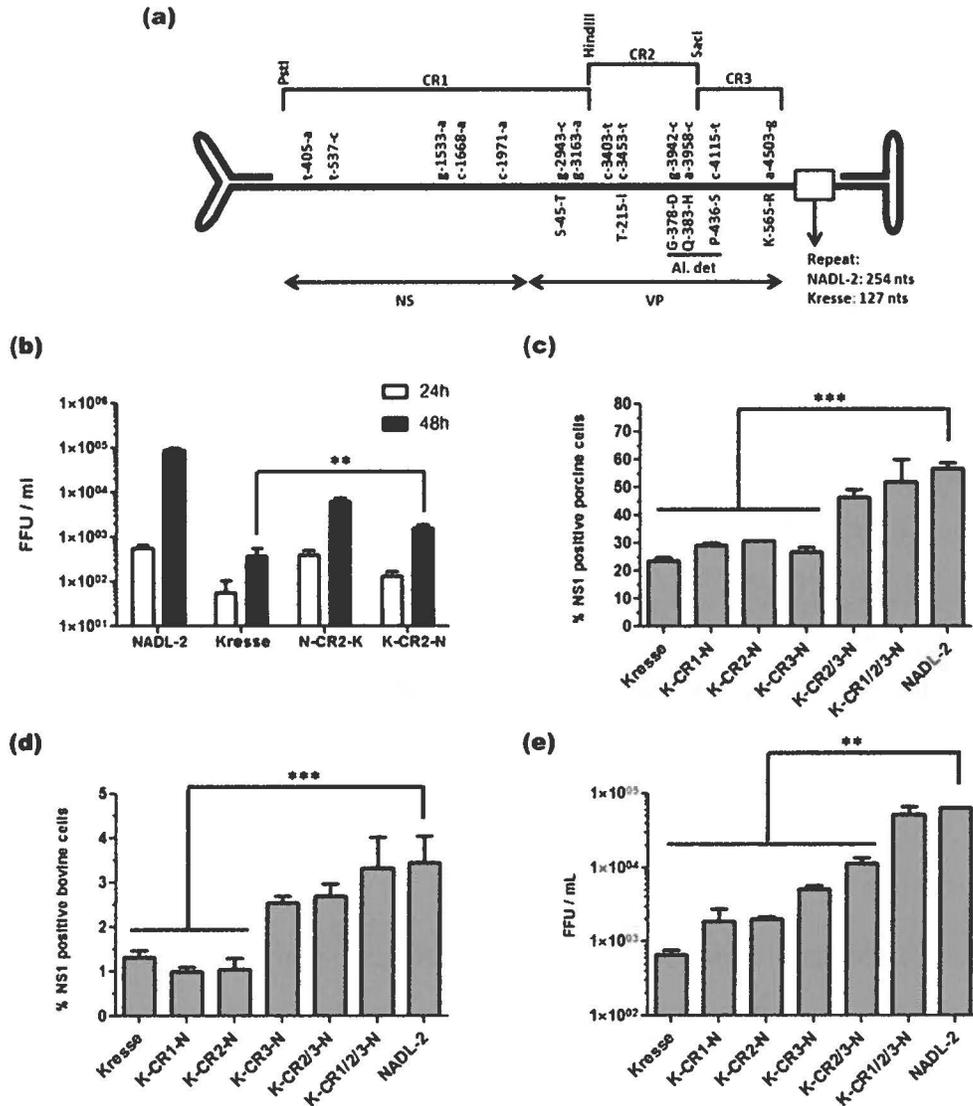


Figure 6. Chimeras of NADL-2 and Kresse strains.

Synonymous and nonsynonymous substitutions between both strains are shown in (a) (details in (Fernandes et al., 2011)). Viral chimeras from both strains were used to identify critical genome differences between NADL-2 and Kresse genomes. First letter in name indicate the background strain and last letter indicates the inserted coding region(s) (CR) from the other strain. (b) The switch of the allotropic determinant in primary TV cells (CR2) was first used. Virus released in the supernatant after infection with designated strain or chimera was measured by titration and results are expressed in FFU ml⁻¹ from triplicate samples. (c-d) Chimeras of the different coding regions were used to identify important genome regions for a good NS1 expression, in porcine (c) and bovine (d) cells. % of NS1 positive cells were determined using DNA staining for the total cells number, in triplicate wells. (e) The same chimeras were used to infect bovine G11 cells and viral titers released in supernatant 48 h p.i. were determined and expressed in (Mean + SD) FFU ml⁻¹ from

duplicate wells. All experiments are representative of three independent experiments. (** $p < 0.005$, *** $p < 0.0001$).

Discussion

Binding and entry

Cell binding and/or viral entry was not a major factor for allotropism in bovine cells, indicating that the first contact between the virus and cells is not an essential tropism determinant (Fig 1), and it was also observed previously in a canine (MDCK) cell line (Oraveerakul *et al.*, 1992, Ridpath *et al.*, 1988). While many parvoviruses utilize classic receptor-mediated endocytosis pathways to enter the cells (J. Hansen *et al.*, 2001, Mani *et al.*, 2006, Parker *et al.*, 2000), fluid phase endocytosis (macropinocytosis) proved also significant for PPV uptake, for both purified and nonpurified virus (Boisvert *et al.*, 2010). Once activated this mechanism does not rely on specific receptor binding, providing a mechanistic explanation as to how parvoviruses may bind and enter cells, regardless of their capacity to support infection. Similarly, adenovirus type 5 virus binding to cells could activate macropinocytosis, and potentiate virus entry (Meier *et al.*, 2004).

DNA processing

Initial processing of incoming DNA genome is an important restriction point for G11 cells (Fig. 2). It remains unclear whether this resulted from lower nuclear delivery of virus or from reduced conversion of the incoming genome to double-stranded intermediates. However, nuclear targeting of parvovirus virions during entry is known to be an inefficient process even in fully permissive cells, and proceeds by mechanisms which have yet to be fully elucidated (Harbison *et al.*, 2008, Mani *et al.*, 2006, Parrish, 2010, Porwal *et al.*, 2013). Low expression of DNA polymerase δ associated factors could explain reduced conversion of incoming virus DNA in bovine cells, since these cellular components are known participants in initial replication of parvovirus genomes.

Increased expression of PCNA in certain cervical cancer isolates has been shown to enhance DNA replication of the parvovirus Adeno-Associated Virus (AAV) (Kang et al., 2009), suggesting that the expression level of these factors can alter parvovirus permissivity.

NS1 Production and DNA replication

A critical early step of PPV replication is the production of multifunctional NS1, involved in multiple steps of the replication cycle (Brandenburger et al., 1990, Rhode, 1985b, Rhode, 1989). Early DNA amplification is lower in porcine cells when infected with Kresse compared to NADL-2 (Fernandes et al., 2011). Here, we showed that Kresse DNA amplification was delayed compared to NADL-2, but reached the same level at 16 h p.i. Since NS1 is implicated in the early step of DNA amplification (Willwand et al., 1998), we hypothesized that NS1 production might be impaired in Kresse infection compared to NADL-2. Indeed, as shown in Fig. 3, NS1 production in Kresse infected cells was observed in only half the cells and was delayed compared to NADL-2 infection, despite the production of similar amounts of mRF DNA template. The synthesis of NS1 was thus an important replication difference between NADL-2 and Kresse infection in porcine cells. In bovine cells, generation of the mRF was clearly impaired compared to porcine cells. NS1 production was significantly impaired in those cells, for both strains, especially for Kresse. NS1 production was clearly a limiting factor in G11 cells. Genome amplification, which requires NS1, was also a restricted in G11 cells infected with Kresse (Fig. 4b). However, since DNA amplification was normalized to entering DNA at 8 h p.i. and very few G11 cells actually amplified virus, it was difficult to accurately measure low, yet effective viral DNA amplification.

Capsid protein production and localization

Infection of G11 cells with NADL-2 resulted in 20% pf infected cells displaying aberrant cytoplasmic capsid localization (Fig. 5). These capsids were not entering virus since this pattern was also observed at low MOI, where entering virus could not be

detected. They could either represent aberrant capsid formation prior to nuclear transport or complete virus not properly exported through the cytoplasm. Capsid formation in the cytoplasm has also been observed after B19 transfection in High Five insect cells (C. Belabani, unpublished observations). In either case, accumulation of capsids in the cytoplasm reduced the efficiency of viral infection, leading to lower amounts of virus released in the supernatant.

Viral chimeras

Differences between NADL-2 and Kresse replication in G11 cells were partially explained by using chimeras of both strains and assessing their capacity to express NS1. Except for the chimera containing all the NADL-2 coding regions (K-CR1/2/3-N), the best Kresse NS1 producing chimera (K-CR2/3-N, Fig. 6c,d) generated the most infectious virus in porcine cells, as demonstrated in our previous study (Fernandes et al., 2011). This chimera also produced the most infectious virus in G11 cells (Fig. 6e). This emphasized the critical role of NS1 for efficient viral replication. Interestingly, the fragment CR2/3 is located in the VP gene and does not involve changes in the NS1 coding sequence. However, the CR2/3 sequences are also present in 3'-untranslated region of NS1 mRNA. These nucleotide changes may alter the mRNA stability or might contain an enhancer element which would be responsible for the observed replication differences between the strains (Barrett et al., 2012).

Overall, PPV was shown to be strongly dependent on cellular factors throughout the course of its replication cycle. In porcine cells, NS1 production greatly depends on cellular processing of incoming viral DNA, and NS1 production was impaired following Kresse infection. To our knowledge this is the first report showing differences in NS1 expression according to the parvovirus strain. In G11 cells, multiple restriction points were observed. Low amounts of DNA processing clearly hindered the rest of the replication cycle. Moreover, even with equivalent amounts of mRF, Kresse replication still led to lower NS1 expression levels than observed with NADL-2. Kresse DNA amplification was also greatly impaired and barely above the detection limits of the

assays. This report also demonstrates that non-host species cells may fully support productive replication of both pathogenic and non-pathogenic PPV strains (F4 bovine cell line Fig. 1). Finally, further analysis of the non permissive cells may provide some interesting findings, pertaining to the cellular factors involved in the different restriction levels observed in these different host cells.

Methods

Cell lines and viral strains

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

Development of CPE after infection

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

Immunofluorescence and viral titers

Indirect immunofluorescence (IF) was carried out as described previously (Boisvert et al., 2010). Titrations were performed on PT cells in 96-well plates. Briefly, at 20 h p.i., cells were fixed in 3% formaldehyde, permeabilized with 3% Triton X-100 and treated with monoclonal antibody 3C9-D11-H11 ("3C9", ATCC CRL-1745, diluted 1:50) which binds to both full and empty capsids, followed by secondary antibody goat anti-mouse Alexa Fluor TM 488 (diluted 1:2000, Invitrogen). Capsid-positive nuclei were counted in triplicate wells containing 20-200 fluorescent foci and titers of the inoculum were calculated as FFU ml⁻¹. For confocal imaging, cells were seeded on glass coverslips in 24-well plates, infected at MOI of 5 FFU, fixed at different times p.i. and permeabilized as described above. Monoclonal antibody 3C9 was used to detect capsids while anti-VP2 antibody (1:1500), generated by a N-terminal peptide immunization of rabbits (Zadori et al., 2005), was used to detect full capsids and VP1 and VP2 in non-assembled states. Monoclonal anti-NS1 (Yeung et al., 1991) was kindly provided by Dr. David Pintel. This antibody was generated against MVM NS1 and mapped to amino acids 656 to 663 (based on MVM sequence, GenBank J02275.1) which are conserved in PPV (GenBank NC_001718.1), except for the last one (T663E). Secondary antibodies were goat anti-mouse or goat anti-rabbit conjugated with either Alexa Fluor TM 568 or Alexa Fluor TM 488 as indicated (all 1:2000, Invitrogen). Coverslips were mounted on glass slides with Fluor PreserveTM (Calbiochem). Images were collected on a Zeiss LSM780 system equipped with 30mW 405 nm diode laser, 25mW 458/488/514 argon

multiline laser, 20mW DPSS 561 nm laser and 5mW HeNe 633 nm laser mounted on a Zeiss Axio Observer Z1 and operated with Zen 2011 software (Zeiss). We used a Plan-APOCHROMAT 63x oil DIC 1.4NA objective for our observations.

Cell cycle (S phase) analysis

Cells were seeded on glass coverslips in 24-well plates to obtain 40-50% confluence after a 24 h incubation. EdU incorporation was established both for one-hour pulses after 24 h of cell growth and over a 24 h period 24 h post-plating. For pulse-labelling assays, coverslips were inverted on 15 μ l of complete medium supplemented with 10 μ M EdU, and incubated for 1 h at 37°C in a humidified incubator under 5% CO₂. Coverslips were then fixed as described above. For the 24 h experiment, cell medium was supplemented with 4.2 μ M Edu at 24 h post plating and incubation was continued for an additional 24 h and fixed as above. After fixation, and permeabilization, cells were labelled with the Click-IT® EdU Cell Proliferation Assay™ (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. Total cell DNA was then stained with Hoechst 33342 (2 μ g ml⁻¹, Sigma) for 30 min. Cells were mounted on glass slides and counted under fluorescence microscope. In each assay, the ratio of Edu-Alexa Fluor™488 labelled cells to total cells (Hoechst) were scored from at least 300 total cells in duplicate slides, from at least 3 independent experiments. Results were expressed as mean + SD percent of cells in S phase.

Virus uptake assays

Cells were seeded on glass coverslip at 5x10⁴ cells per well. The day after, cells were infected with either NADL-2 or Kresse virus at an MOI of 5. At 2 h p.i., cells were extensively washed with PBS and were harvested in STE buffer (1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM, Tris-HCl, pH 7.5). DNA was extracted as described before (Boisvert et al., 2010). Purified DNA samples were diluted 1:10 for PCR purposes. Cell-associated viral DNA was quantified by qPCR.

qPCR

qPCR on PT cells was performed as described (Boisvert et al., 2010). For bovine cell normalization, bovine c-myc (GenBank AF519455) was cloned in pSmarHC-AmpR (GenBank AF399742) using forward primer 5'-CTTAAGCTTGAATCGGGGTC-ACCCTCT-3' and reverse primer 5'-CTGTCTAGAGTAGCTGTTCAAGTTTGAG-TTCAAC-3' between HindIII and XbaI sites. qPCR was performed with forward primer 5'-AGCGCCAGAGGAGAAACGAG-3' and reverse primer 5'-GTTTCAACTGTT-CTCGCCTCTTCTG-3' and was linear in the range of 0.5 fg to 1 ng. Primer specificity was verified using BLAST analysis and melting curve analysis from 60°C to 95°C with a temperature increase at each stop of 1°C for 30 sec. Viral DNA was expressed in genome copy equivalents (GCE). Results shown are either GCE or Mean Fold Increase + SD (Log GCE) from at least 3 independent experiments.

Southern blotting

Cells were seeded in duplicate wells of a 6-well plate (2×10^5 cells/well) and infected with either viral strain (MOI of 5). At each time point p.i., cells were harvested with trypsin. Cell pellets were resuspended in 200 μ l STE, and frozen at -20°C until DNA was extracted as described (Boisvert et al., 2010) but DNA was resuspended in a final volume of 40 μ l H₂O. Total DNA extracted for each sample was loaded on a 0.8% agarose gel and electrophoresis was carried out at 80 V for 2.5 h. Southern blot was performed as described in Dig Application guide for Filter Hybridization (Roche Applied Science). Briefly, DNA was depurinated, denatured, neutralized and vacuum-transferred to positively-charged nylon membranes and fixed by UV-crosslinking. A PCR fragment of the PPV NS coding region was labelled by random-priming with DIG-High-Prime and was hybridized to membranes. Detection of the probe was performed with monoclonal anti-DIG antibody (Roche Applied Science) and alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse (AP) secondary antibody (1:1000, Bio-Rad). Colorimetric detection was carried out with NBT/BCIP (Roche Applied Science) according to the manufacturer's recommendations. Blots shown are representative of at least three independent experiments.

Western Blot

Western blot experiments were done as described before (Boisvert et al., 2010). Briefly, after infection with either strain, PT cells were lysed at indicated time post infection. An equivalent amount of cell lysate from each sample was loaded on a 10% acrylamide gel. After transfer on nitrocellulose membrane and blocking, incubation with primary antibody was performed with monoclonal mouse anti-NS1 as described in immunofluorescence section, diluted 1:100, together with monoclonal mouse anti-actin (1:200, Santa Cruz Biotechnologies) as loading control. Secondary antibody was goat anti-mouse conjugated with alkaline phosphatase (1:1000, Bio-Rad). Detection was performed with NBT-BCIP colorimetric substrate (Roche Applied Science) according to manufacturers' instructions.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Dr. David Pintel (University of Missouri) for the anti-NS1 antibody, Jessy Tremblay and Marcel Desrosiers for technical expertise with the confocal microscopy imaging, Dr. Mohamed Laakel for help in establishing the bovine cell lines, and Dr. Zoltan Zadori for helpful discussions. This research was funded in part by a grant from the Natural Sciences and Engineering Council of Canada (NSERC) to P.T., a scholarship from NSERC to M.B. and the Fondation Armand-Frappier scholarships to S.F. and M.B.

CHAPITRE 5 : DISCUSSION

Ce projet de recherche avait pour objectif principal de mieux comprendre les interactions entre le parvovirus porcin (PPV) et la cellule hôte permettant la réplication virale. En effet, ce virus dépend de la cellule à plusieurs niveaux lors de l'infection. Nous avons trois objectifs spécifiques pour ce projet. Le premier objectif était de déterminer des composantes cellulaires essentielles aux étapes précoces de l'infection. Le second objectif était de mettre à jour les séquences des protéines structurales qui sont importantes pour leur reconnaissance et leur transport au noyau. Le troisième objectif était de déterminer si l'expression de la protéine virale multifonctionnelle et essentielle NS1 était différente pour deux souches virales, et si l'expression de NS1 est une étape limitante dans une lignée cellulaire semi-permissive.

5.1 Les composantes cellulaires essentielles aux étapes précoces

Les étapes précoces de l'infection par les parvovirus débutent par des interactions entre la capsid virale et les composantes de la surface de la cellule et se terminent par la livraison du génome au noyau. Souvent, ces étapes sont importantes dans la détermination du tropisme d'un virus, notamment via l'interaction avec un récepteur spécifique qui peut être restreint à un type cellulaire spécifique ou à une espèce spécifique. Nous avons choisi d'étudier les composantes cellulaires impliquées dans les étapes précoces de l'infection par le PPV avec une gamme d'inhibiteurs chimiques. Notre choix a été motivé par leur disponibilité et leur coût raisonnable, permettant de faire une étude globale. De plus, le modèle cellulaire utilisé, des cellules fibroblastiques de testicule de porc (cellules PT), est généralement transfecté avec des taux de succès limités (non montré) complexifiant des travaux avec des ARN interférents (ARNi). Donc malgré le fait que les ARNi sont souvent préférés pour leur spécificité, les inhibiteurs chimiques nous ont permis d'obtenir un traitement uniforme des cellules, ce qui était un avantage dans notre système cellulaire. Nous avons aussi utilisé plus d'un inhibiteur chimique par composante cellulaire étudié, pour limiter les risques d'obtenir des résultats via un effet secondaire. L'utilisation de plusieurs concentrations d'inhibiteurs permet d'obtenir des résultats dose-réponse, et de trouver

des concentrations efficaces, tout en étant non toxique et en causant le moins possible d'effets non spécifiques. Cette méthode permet aussi de faire des cinétiques d'inhibition et ainsi de déterminer jusqu'à quel moment une composante cellulaire est importante pour le virus. Finalement, un autre avantage de l'utilisation d'inhibiteurs chimiques est le fait qu'il est possible de traiter les cellules sur une période de temps plus courte, limitant l'établissement de mécanismes de compensation par la cellule (Boisvert *et al.*, 2012).

5.1.1 Attachement et entrée

Avec cette stratégie nous avons d'abord montré que le virus doit absolument se lier aux acides sialiques sur les protéines de surface (1^{er} article, figure 2). Ce premier contact pourrait être utilisé pour stabiliser le contact avec un récepteur spécifique. Il n'y a pas de récepteur spécifique connu pour le PPV. Cependant, ce virus peut infecter plusieurs organes *in vivo*, tant chez l'adulte infecté, que chez le fœtus où l'infection par certaines souches peut être fatale. On peut donc penser que ce récepteur pourrait être ubiquitaire, ou bien qu'il y ait plus d'un récepteur possible. Nous avons aussi montré que ce premier contact est essentiel pour l'infection, et ce, peu importe le mode d'entrée utilisé. Bien que l'inhibition des voies d'entrée ne bloquait pas totalement l'infection par le PPV, le clivage des acides sialiques, lui pouvait bloquer l'infection complètement. Ceci suggère que ce premier contact permet, soit la liaison à un second récepteur, ou permet l'activation de signalisation cellulaire, permettant l'entrée. Par exemple, on peut rapprocher cette hypothèse de l'infection par adénovirus qui active la macropinocytose via l'attachement aux intégrines, cette activation est dépendante de l'actine, RhoGTPase et PKC (Meier *et al.*, 2004). De plus, nos essais de reconstruction *in vitro* ont montré que le PPV peut se lier autant à des acides sialiques construits avec une N-sialyltransférase qu'une O-sialyltransférase (1^{er} article, figure 2). Nous n'avons pas été capables de rétablir complètement le niveau d'infection lors de ces expériences. Il est possible que les structures utilisées par le virus lors d'une infection normale soient plus complexes que ce qui peut être recréé *in vitro* ou bien que notre reconstruction ne soit pas efficace sur toutes les cellules.

Ensuite, nous avons montré que le PPV peut être internalisé par l'endocytose dépendante de la clathrine (1^{er} article, figure 3 A-D). Ce mode d'entrée dépend d'une interaction avec un récepteur spécifique et est hautement régulé. D'ailleurs, plusieurs parvovirus utilisent ce mode d'entrée (Parker *et al.*, 2000, Quattrocchi *et al.*, 2012, Vendeville *et al.*, 2009). Cependant, dans le cas du PPV, les taux d'inhibition de l'infection en bloquant l'endocytose via la clathrine ne dépassaient jamais 50 %, même avec des doses fortes où des effets toxiques commençaient à être visibles. Ceci suggère l'utilisation d'un mode d'entrée alternatif. En effet, nous avons aussi observé une inhibition de 50 % de l'infection en bloquant l'entrée par la macropinocytose. Ce mode d'entrée n'est pas spécifique et doit généralement être activé par un premier contact entre le virus et la cellule. Le PPV est le premier virus de la famille pour lequel la macropinocytose est un mode d'entrée important. Ce résultat est en concordance avec le fait que ce virus peut être internalisé dans certains types cellulaires, sans permettre la réplication complète (Fernandes *et al.*, 2014, Oraveerakul *et al.*, 1992). La restriction du tropisme semble donc se situer après l'entrée.

De façon intéressante, la combinaison de l'inhibition de ces deux modes d'entrée n'a pas été suffisante pour bloquer complètement l'infection par le PPV. Il est donc possible d'une part que nos inhibitions n'étaient pas complètes, ou bien qu'un autre mode d'entrée alternatif soit possible pour le PPV. L'utilisation de plus d'un mode d'entrée peut être bénéfique pour un virus qui infecte plusieurs types cellulaires, comme le PPV. Il est possible qu'un mode d'entrée soit prédominant dans certains types cellulaires, et que l'utilisation de plusieurs modes d'entrée soit un facteur important de la capacité du virus à infecter plusieurs tissus *in vivo*. Concernant les modes d'entrée alternatifs, souvent appelés « non clathrine, non cavéoline », ils sont peu connus à ce jour (Hansen *et al.*, 2009). Par exemple, le virus AAV2 utilise l'entrée par endocytose CLIC/GEEC (Clathrin-Independant Carriers and GPI-Enriched Endocytic Compartments) récemment décrit (Boisvert *et al.*, 2012, Lundmark *et al.*, 2008, Nonnenmacher *et al.*, 2011). Suite à l'activation et la signalisation via les petites protéines G, il y a formation de vésicules de forme tubulaire. Ce mode d'entrée dépend

de la protéine GRAF1, qui en est donc un bon marqueur. Ce mode d'entrée dépend aussi de la dynamine pour relâcher la vésicule dans le cytoplasme.

D'autres virus utilisent des modes d'entrée alternatifs. Le virus SV40 est connu pour entrer dans les cellules via endocytose dépendante de la cavéoline (Norkin, 1999). Cependant, ce n'est pas le seul mode d'entrée possible pour ce virus, car le SV40 peut entrer dans des vésicules dépourvues de cavéoline (Damm *et al.*, 2005). Le mécanisme dépend du cholestérol et transporte le virus au réticulum endoplasmique, comme lors de l'entrée dépendante de la cavéoline. Le papillomavirus humain HPV16, important agent lié au cancer du col de l'utérus, peut aussi entrer dans les cellules par un mécanisme indépendant de la clathrine et de la cavéoline (Spoden *et al.*, 2008). Le virus s'associe avec les tetraspanines CD63 et CD151 pour entrer dans les cellules. Finalement, le virus influenza est largement connu pour utiliser l'endocytose dépendante de la clathrine, mais, l'infection des cellules est possible lors de l'inhibition de ce mode d'entrée (Sieczkarski *et al.*, 2002b). De plus, lors de cette étude, l'inhibition simultanée de l'endocytose via la clathrine et la cavéoline n'a pas empêché l'infection, suggérant encore un mode d'entrée alternatif, non encore décrit dans la littérature.

Finalement, nous avons montré que l'amplification virale mène à la formation d'agrégats qui utilisent préférentiellement la macropinocytose, alors que les particules isolées (ou purifiées) utilisent préférentiellement l'endocytose dépendante de la clathrine (1^{er} article, figure 3 E). Cette observation est unique chez les parvovirus et très intéressante puisque l'infection naturelle chez l'hôte est lytique et certainement propice à la formation d'agrégats qui pourront infecter les cellules voisines par macropinocytose. Dans le même ordre d'idée, ce résultat montre que l'utilisation de préparations virales hautement purifiées (composées de particules isolées) en laboratoire ne serait pas représentative de l'infection normale, qui combinerait des particules isolées et des agrégats. Nous avons donc utilisé des productions virales brutes pour les travaux décrits dans cette thèse. Ces productions consistent en le

surnaissant d'infection, après une brève centrifugation pour retirer les gros débris cellulaires.

5.1.2 Composantes intracellulaires

Une fois dans la cellule, le virus utilise la voie endosomale, dont l'acidification est essentielle (1^{er} article, figure 4). Cette étape est souvent utilisée par les virus pour initier des changements de conformation, permettant la suite de l'infection (Greber *et al.*, 1993, Mainou *et al.*, 2012, Sturzenbecker *et al.*, 1987). Dans le cas des parvovirus, ces changements de conformation incluent le clivage de la région N-terminale de VP2, permettant d'une part de retirer les signaux d'export de la capsid, et d'autre part de créer de l'espace pour l'externalisation de la région N-terminale de VP1 (Farr *et al.*, 2006). L'externalisation de VP1 permet d'abord l'évasion de la voie endosomale grâce à l'activité enzymatique de type phospholipase (PLA₂) découverte par notre laboratoire (Farr *et al.*, 2005, Zadori *et al.*, 2001). Cette région contient aussi des signaux de localisation nucléaire classiques permettant à la capsid d'être transportée vers le noyau (Section 5.2.1).

Nous avons aussi montré que le cytosquelette d'actine et les microtubules sont tous deux importants pour l'infection par le PPV. Les microtubules sont utilisés pour le bon fonctionnement et la maturation des vésicules dans la voie endosomale. Ce n'est donc pas surprenant que le PPV utilise les microtubules. Il demeure inconnu si le PPV utilise directement les microtubules après la sortie de la voie endosomale. Dans un contexte similaire, la capsid du parvovirus canin (CPV) interagit avec la protéine cellulaire dynéine, qui est un moteur rétrograde des microtubules, permettant le transport vers le centre d'organisation des microtubules situé près du noyau (Leopold *et al.*, 2006). De plus, des études effectuées avec le protoparvovirus de rongeurs MVM ont montré que les filaments intermédiaires sont aussi importants pour l'infection (Fay *et al.*, 2013). Nos travaux publiés en 2010 n'incluaient pas l'inhibition des filaments intermédiaires. Cependant, des travaux complémentaires d'inhibition des filaments intermédiaire avec un traitement des cellules avec de l'acrylamide ont montré que cette

troisième composante du cytosquelette est aussi importante pour le PPV (Annexe 1, figure 1). Les filaments intermédiaires sont une unité structurale importante de la cellule (Herrmann *et al.*, 2007). Il est possible que l'intégrité de la structure cellulaire soit essentielle à l'infection. Cette intégralité pourrait être importante pour les transports nucléo-cytoplasmiques essentiels pour le bon déroulement de l'infection (Nuesch *et al.*, 2005).

Les travaux effectués avec MVM ont aussi montré que les microtubules sont activement protégés lors de l'infection (Nuesch *et al.*, 2005). En effet, les auteurs ont montré que l'ajout d'un agent dépolymérisateur des microtubules tard dans l'infection ne permet pas la destruction du réseau. Nous avons nous-mêmes observé que l'ajout du nocodazole 10h p.i. n'avait aucun effet sur la réplication virale (1^{er} article, figure 4 C). Il y a deux explications possibles pour ce résultat. D'abord, il est possible que les microtubules soient importants seulement lors des étapes précoces de l'infection, et alors leur destruction plus tard dans l'infection n'a plus d'effet sur la production de particules virales. Deuxièmement, il est possible que les microtubules soient aussi activement protégés lors de l'infection par le PPV. Afin de vérifier cette seconde hypothèse, nous avons traité des cellules avec un agent dépolymérisateur des microtubules (nocodazole) à différents temps avant ou pendant l'infection. Les cellules ont été fixées 2h post traitement. Une immunofluorescence (IF) avec un anticorps spécifique aux microtubules a montré que, contrairement au virus MVM, l'infection par le PPV ne protège pas les microtubules contre la dégradation par le nocodazole (Annexe 1, figure 2). Il serait intéressant d'évaluer plus en détail les effets du PPV sur l'architecture de la cellule.

Finalement, nous avons montré que le protéasome est essentiel au bon déroulement de l'infection par le PPV (1^{er} article, figure 5). Nous avons aussi co-immunoprécipité la capsidie du virus avec l'ubiquitine, qui est la modification des protéines permettant la dégradation. Cependant, nous n'avons pas observé de changement dans le poids observé de VP2, suggérant que la modification pourrait se

situer au niveau de VP1. En effet, la détection de VP1 est assez limitée. Une possibilité de rôle pour le protéasome serait de cliver et dégrader la partie N-terminale unique de VP1. L'expression de VP1 en grande quantité semble toxique pour la cellule, et cet effet serait dû à l'action de la phospholipase virale. Le clivage et la dégradation de la partie N-terminale de VP1 pourrait diminuer la toxicité en cours d'infection. Ce type de dégradation partielle et sélective par le protéasome existe pour la sous-unité p105 du facteur de transcription de NF- κ B (Section 1.7.2). De plus, si le clivage de VP2 en VP3 est reconnu comme étant important pour créer de l'espace pour l'externalisation de VP1, il est possible que le clivage de VP1 permette la déstabilisation de la capsid, et donc la libération du génome au noyau. On n'a pas déterminé si l'interaction entre le PPV et le protéasome se déroule au cytoplasme ou au noyau. Nous croyons que les signaux de localisation nucléaire de VP1 sont essentiels à la livraison au noyau de la capsid en début d'infection (Section 5.2.1). Dans cette optique, si le protéasome est utilisé pour cliver la région N-terminale de VP1, l'interaction aurait plutôt lieu au noyau. D'un autre côté le protéasome pourrait être utilisé par le virus pour éliminer des protéines cellulaires qui bloqueraient la réplication virale. En soutien à cette hypothèse, l'infection par le virus MVM mène à la dégradation de la protéine cellulaire p21 par le protéasome (Adeyemi *et al.*, 2012). Cette stratégie permet de bloquer le cycle cellulaire à la frontière G2/M et favorise la réplication virale.

Des travaux futurs seront nécessaires pour éclaircir le rôle de l'ubiquitination et de l'activité du protéasome pour l'infection. L'analyse structurale de la capsid nous a permis de constater qu'il y a seulement trois lysines exposées à l'extérieur de celle-ci. Les résidus lysines sont connus pour être la cible d'ubiquitination (Hicke, 2001). L'autre possibilité est l'ubiquitination au niveau des régions N-terminales des protéines de la capsid qui sont externalisées. Il y a 17 lysines dans la région unique de VP1. La mutation des lysines de surface dans le clone infectieux a été tentée et a résulté en des virus non répliatifs. Cependant, il est difficile de déterminer si ce résultat est lié à l'ubiquitination ou à un problème structural. En effet, la mutation des trois lysines rend le clone infectieux incapable de former des capsides suite à la transfection. La mutation d'une seule lysine (K163A) permet la formation de capsid, mais pas l'amplification

virale. Il serait intéressant de mieux caractériser ce mutant, mais, comme discuté dans la section 5.2, notre système de transfection de clone infectieux mutant est très peu efficace et limite grandement l'étude de clones infectieux non réplicatifs.

5.2 Les signaux et motifs de localisation nucléaire des protéines de la capsid du PPV

Les parvovirus, comme la plupart des virus avec un génome d'ADN utilisent le noyau de la cellule pour la majorité de leur cycle de réplication. Ceci suppose un transport spécifique des composantes virales vers le noyau. Nous nous sommes intéressés particulièrement au transport des protéines de la capsid vers le noyau. Ce type de transport est requis à deux étapes du cycle de réplication : durant les étapes précoces pour livrer le génome au noyau et durant l'infection tardive, afin de permettre l'assemblage de nouvelles particules virales au noyau.

Le transport au noyau de protéines de grande taille se fait de façon active, suite à la reconnaissance d'une région basique sur la protéine à transporter par la machinerie de transport nucléaire (Macara, 2001). Nous avons donc cherché à identifier les régions basiques des protéines VP1 et VP2 qui sont des signaux de localisation nucléaires (NLS) actifs. Une analyse primaire des séquences des protéines VP1 et VP2 nous a permis de déterminer que seule la partie unique de VP1 comprenait des régions avec plus de deux acides aminés basiques à proximité (Annexe 1, figure 3). En effet, rappelons que la protéine VP1 contient la séquence complète de VP2 ainsi qu'un prolongement N-terminal unique. Comme la portion commune de VP1 et VP2 ne contient aucune région avec plus de deux acides aminés basiques à proximité, nous avons émis l'hypothèse que le repliement des protéines, ainsi que leur assemblage en trimère sont requis pour rapprocher les acides aminés basiques et créer un NLS actif. Pour différencier les deux types de séquences, nous avons appelé les régions dépendantes de la structure des « motifs » de localisation nucléaire (NLM) comme il a

été suggéré par Lombardo et ses collègues lors de leurs études sur le protoparvovirus MVM (Lombardo *et al.*, 2000).

Nous avons utilisé deux stratégies différentes pour évaluer les NLS potentiels de la région unique de VP1 ainsi que les NLS potentiels de VP2. D'abord pour évaluer le transport au noyau de la région unique de VP1, nous avons choisi de créer une protéine de fusion entre une portion de VP1 et la protéine fluorescente mCherry. Cette stratégie nous a permis d'évaluer les NLS potentiels sans interférence par un motif formé lors de l'assemblage en trimère. Nous avons utilisé une section de VP1 qui n'implique pas de contacts intra-trimérique selon l'analyse de la structure déterminée par cristallographie aux rayons X (2^e article, figure 1) (Simpson *et al.*, 2002). Nous n'avons pas utilisé seulement la portion unique de VP1 puisque les travaux effectués précédemment dans le laboratoire par Véronique Bouchard-Lévesque ont montré que cette construction est trop petite pour être efficacement exclue du noyau, même en inactivant tous les NLS potentiels. Notre nouvelle construction, formée des 412 premiers acides aminés de VP1 (nommée VP1-412-mCherry) était suffisamment grande pour observer une exclusion quasi totale du noyau lors de l'inactivation des NLS potentiels (2^e article, figure 2).

5.2.1 Signaux de localisation nucléaire de VP1up

Avec la première stratégie, nous avons montré dans la 2^e publication qu'il y a deux NLS actifs majeurs dans VP1up (2^e article, figure 3 A-D). Le premier est un NLS classique de type Pat7 (PPAKRAR) et le second est un NLS classique de type bipartite (KR-X₁₁-KKKAK) (Macara, 2001). Nous avons confirmé ces résultats en utilisant un autre système. Nous avons fusionné seulement les NLS avec la protéine EGFP (2^e article, figure 3 E). La protéine EGFP est relativement petite et se retrouve normalement autant au noyau qu'au cytoplasme par diffusion passive. En lui ajoutant un NLS actif de VP1, nous avons montré que EGFP se retrouvait alors presque exclusivement au noyau, confirmant l'activité NLS des régions BR1 et BR45. De plus, bien que l'inactivation de BR1 en combinaison avec BR4 ou BR5 bloque le transport nucléaire de la protéine de fusion (2^e article, figure 3 B), nous n'avons pas conclu que les

combinaisons BR14 ou BR15 serait un NLS bipartite puisqu'il y a plus de 100 acides aminés entre BR1 et BR4. Aussi, il est connu que l'inactivation de la moitié d'un NLS bipartite est suffisante pour bloquer le transport au noyau (Gomez Corredor *et al.*, 2009, Robbins *et al.*, 1991). Finalement, les résultats de cette expérience montrent que chacun de ces NLS est suffisant pour transporter la protéine de fusion au noyau. En effet, l'inactivation de toutes les régions basiques sauf BR1 (mutant BR2345, 2^e article, figure 3 D), ou bien l'inactivation de tous les BRs sauf BR45 (mutant BR123, 2^e article, figure 3 C), ne bloque pas le transport au noyau de la protéine de fusion.

Nous avons cependant observé que, lors de l'inactivation de ces deux NLS, une proportion des cellules exprimant notre construction VP1-412-mCherry montraient une localisation diffuse, soit autant au noyau qu'au cytoplasme. Ceci pourrait être dû à une faible activité NLS des autres régions basiques. En effet, l'inactivation de toutes les régions basiques a augmenté la proportion de cellules dans lesquelles VP1-412-mCherry se situait seulement au cytoplasme. Une autre possibilité est la présence de division cellulaire après l'expression de notre protéine de fusion. Ainsi, il serait possible qu'une partie des protéines se retrouvent à l'intérieur du noyau nouvellement formé sans y être transporté spécifiquement. Malgré le fait que les régions BR2 et/ou BR3 aient potentiellement une faible activité de transport nucléaire, l'inactivation des deux NLS principaux dans un clone infectieux du PPV a été suffisante pour bloquer complètement la réplication virale (2^e article, figure 4 A). Ceci signifie que l'activité résiduelle de transport des régions BR2/3 n'est pas suffisante pour remplacer les NLS montrés dans nos travaux. Nous avons aussi observé un faible transport au noyau de la protéine GFP en lui fusionnant la région BR3 ou BR23, confirmant la faible activité NLS (2^e article, figure 3 E). Nous avons aussi observé une légère diminution dans l'efficacité de la réplication virale en inactivant un seul NLS (BR1 ou BR45) ou en inactivant les régions non impliquées dans le transport au noyau (BR2-3 2^e article, figure 4 B-D). Cependant, ces différences ne sont pas très grandes (< 1 log), et pourraient représenter une diminution de la stabilité de la structure, ou dans le cas de l'inactivation d'un NLS, une légère diminution du transport au noyau.

Les NLS des protéines de la capsidie peuvent agir pour transporter le génome au noyau lors de l'infection précoce ou bien lors de l'infection tardive pour transporter les trimères au noyau avant l'assemblage des nouvelles particules virales. Le clone infectieux portant des mutations des deux NLS de VP1 est incapable de compléter son cycle de réplication (2^e article, figure 4 A). Cependant, nous avons montré que la transfection du mutant contenant l'inactivation des deux NLS de VP1 mène à la production efficace de capsidie au noyau, par l'observation en IF des capsides au noyau 30h post transfection (2^e article, figure 4 E). Donc, les protéines nouvellement synthétisées peuvent être efficacement transportées au noyau et assemblées en capsidie. Ceci était attendu puisque l'assemblage en trimère permet la formation d'un NLM, essentiel pour le transport de VP2 au noyau, et pouvant compenser l'absence des NLS de VP1. Nous avons aussi montré que ces capsides contiennent l'ADN viral par une immunoprécipitation suivie d'un PCR quantitatif (2^e article, figure 4 F). Finalement, nous avons montré que ces capsides contiennent bien la protéine VP1 par immunoprécipitation et immunobuvardage de type western. VP1 est essentielle pour l'évasion de la voie endosomale (2^e article, figure 4 G). Tous des éléments suggèrent fortement que le rôle des NLS de la région unique de VP1 se situe lors des étapes précoces de l'infection, pour transporter le génome au noyau.

De façon intéressante, nous avons observé que la localisation de VP2, lors de la recherche du NLM, était bien plus constante d'une cellule à l'autre par rapport à ce qui a été observé pour VP1. En effet, les photos prises lors des expériences avec VP2 représentent la localisation de la protéine pour l'ensemble des cellules. Cependant avec VP1, plusieurs patrons étaient observés. Il est possible que la protéine de fusion (VP1-412-mCherry) ait une structure dont le repliement était non constant ou instable, ce qui pourrait compromettre la disponibilité d'un NLS. Il est aussi possible que le repliement de la protéine de fusion cause la formation d'un motif avec quelques acides aminés basiques à proximité, formant un NLM de faible activité. Ceci expliquerait le fait qu'on observe souvent des protéines diffuses dans le noyau et le cytoplasme, même après la l'inactivation des deux NLS actifs de VP1up.

5.2.2 Motifs de localisation nucléaire de VP2

Concernant le transport au noyau des protéines structurales nouvellement synthétisées en fin d'infection, celui-ci se fait après l'assemblage des protéines structurales en trimère. En effet, cette association protéique est très efficace et très stable (Wu *et al.*, 1993). Des travaux ont montré que le trimère est la seule sous-unité de la capside qui peut être détectée lors de l'infection (Riobos *et al.*, 2006). La stratégie choisie pour identifier le motif de localisation nucléaire (NLM) du PPV, a été d'insérer des mutations directement dans le clone infectieux. Nous avons choisi de substituer les acides aminés basiques en glycine afin d'obtenir une certaine flexibilité, favorisant l'assemblage en capside malgré ces substitutions. L'utilisation directe du clone infectieux lors de ces travaux nous a permis d'évaluer rapidement trois éléments suite aux différentes substitutions de résidus. Nous avons pu évaluer par IF la localisation de VP2, qui se situe normalement pratiquement exclusivement au noyau, suggérant un transport très efficace. Nous recherchions donc des substitutions pour lesquelles VP2 était retenue au cytoplasme. Ensuite, toujours en IF, nous avons déterminé si les divers mutants étaient capables de s'assembler en capside. Dans une autre étude avec le MVM, le bloc de transport au noyau de VP2 empêche l'assemblage en capside, malgré la présence de trimères contenant VP1 au noyau (Lombardo *et al.*, 2002). Dans ce cas, une trop grande quantité de VP1 menait plutôt à la formation d'agrégats de protéines structurales de grandes tailles. Finalement, l'utilisation de clones infectieux permet aussi d'évaluer la production de virus infectieux après la transfection, en effectuant un titrage des surnageants 48 h après la transfection.

Le premier NLM identifié chez les parvovirus est celui du virus MVM. Ce motif dépend de la formation d'un feuillet- β lors de l'assemblage en trimère (Section 3.2, figure 1.14). Ce NLM est aussi retrouvé chez le virus CPV, mais est très peu conservé chez le PPV (Section 4.2, figure 1.15). Nous avons donc utilisé la structure de la capside obtenue par cristallographie aux rayons X (Simpson *et al.*, 2002) et le programme Pymol afin de visualiser la position des résidus basiques en contexte de

trimère. Nous avons observé très peu de résidus basiques en périphérie du trimère, et il est donc peu probable qu'un NLM dépende de l'assemblage en capsid. Nous avons identifié trois régions d'intérêt comportant un rapprochement de plus de deux acides aminés basiques (2^e article, figure 5). Sur la face externe du trimère, nous avons identifié une région comportant trois acides aminés basiques parfaitement alignés (région basique externe : R374, R393, R565). Sur la face interne du trimère, nous avons observé que l'agencement des acides aminés K475 et R477 formait une région basique centrale de six acides aminés basiques. Finalement, encore sur la face interne du trimère, conjointement avec deux des acides aminés impliqués dans le NLM de MVM (K533 et R535), la région basique interne comporte plusieurs acides aminés basiques à proximité (K272, K275, K487, R576). Suite à nos expériences de transfections, nous avons observé que seules les substitutions de résidus de la région basique interne bloquaient significativement le transport de VP2 au noyau (2^e article, figure 5). La substitution R374G donne aussi une protéine VP2 partiellement retenue au cytoplasme. Cependant cet acide aminé est situé directement au contact entre deux protéines dans le trimère. Il est donc possible que la structure du trimère soit affectée par cette substitution. Nous avons effectivement observé un patron de migration des protéines structurales différent pour ce mutant (2^e article, figure 7 F). La structure des trimères de ce mutant est donc probablement compromise. Ainsi, le NLM du PPV est partiellement conservé avec le MVM, mais est plus complexe, nécessitant des résidus en dehors du feuillet- β . Cette région se retrouve à l'intérieur de la capsid lors de l'assemblage et peut donc seulement être utilisée lors des étapes tardives de l'infection pour le transport des trimères au noyau.

Nous avons ensuite vérifié la capacité des mutants à produire des particules infectieuses. Nous avons procédé à un titrage du surnageant des cellules transfectées avec les clones infectieux mutants. Nous avons observé que plusieurs mutants qui étaient capables de s'assembler en capsid suite à la transfection ne produisaient pas de particules infectieuses (2^e article, figure 7 A). Notamment, les mutants de la région basique externe étaient tous non infectieux. Nous avons pensé que la liaison du virus aux cellules pouvait être altérée, mais, en utilisant la technique de PCR quantitative,

nous avons observé que ces virus entrent bien dans les cellules (non montré). Cependant, même si cette région n'est pas essentielle à l'entrée, elle pourrait être importante pour d'autres interactions en cours d'infection.

Le clone portant la substitution K487G était aussi non infectieux. Cet acide aminé est situé à l'intérieur de la capside. Nous ne savons pas pour le moment ce qui empêche la réplication de ce mutant. Il sera important d'élaborer un système permettant de produire une plus grande quantité de virus mutants non infectieux afin d'étudier ces virus non répliqués. Nous avons aussi observé que les mutants qui sont capables de compléter le cycle de réplication viral sont moins efficaces que le virus sauvage (2^e article, figure 6 B-D). Ces virus produisent moins d'ADN et moins de particules virales infectieuses. Pour le clone portant la substitution R477G, les différences sont relativement faibles (< 1 log) et, d'un point de vue statistique, le rapport GCE/FFU, représentant l'efficacité globale, n'est pas statistiquement significativement différent du virus sauvage. Il se peut que la structure de la capside soit moins stable, ou moins performante lors des étapes précoces de l'infection. Pour le clone portant la substitution K272G, les différences sont plus grandes et plus significatives. Ce mutant transporte peu de VP2 au noyau à la fin de l'infection comme montré dans la figure 5. Il est donc normal de retrouver moins de virus infectieux relâchés. De plus, la disponibilité des capsides est essentielle à la génération de génome viral d'ADN simple brin. Donc, on s'attend à retrouver moins de copies de génome (GCE) pour ce mutant (Hardt *et al.*, 1983, Miller *et al.*, 2002).

Il était aussi important de confirmer la présence de trimères pour les clones dont VP2 était retenue au cytoplasme. En effet, une substitution qui prévient l'assemblage en trimère empêche automatiquement le transport au noyau. Nous avons choisi d'effectuer un « crosslink » chimique des protéines avant de les séparer sur gel d'acrylamide pour voir les différentes formes de VP2. Les transfections sont peu efficaces dans les cellules porcines, et encore moins efficaces pour les clones infectieux comparativement à une protéine seule. Nous avons donc comparé l'efficacité d'expression des protéines

virales entre les cellules porcines (PT) et des cellules reconnues pour être facilement transfectables (Cos-7). Nous avons observé en IF, en utilisant le clone infectieux de type sauvage qu'il y avait au moins 10 fois plus de cellules Cos-7 qui exprimait les gènes viraux suite à la transfection comparativement aux cellules PT. De plus, nous avons observé avec un immunobuvardage de type western que le signal de VP2 était à peine visible avec les cellules PT et relativement fort avec les cellules Cos-7 (2^e article, figure 7 E). Nous avons donc procédé aux expériences avec les mutants en utilisant les cellules Cos-7. De plus, certaines lignées cellulaires, incluant les cellules Cos-7, ont la capacité d'exprimer les gènes viraux suite à la transfection d'un clone infectieux d'un membre de la famille *Parvoviridae* (Canine minute virus, CnMV, un bocaparvovirus (F. Li *et al.*, 2014)). Les cellules Cos-7 transfectées avec le clone infectieux produisent des virions complets et infectieux suite à la transfection du clone infectieux. Ces cellules semblent donc un bon modèle pour l'expression de protéines de parvovirus. Nos résultats ont montré que tous les mutants avaient la capacité de former des trimères, comme le clone de type sauvage (2^e article, figure 7 F). Deux mutants ont aussi montré une bande intermédiaire, pouvant représenter des dimères ou autres associations incorrectes. Cependant, les mutants d'intérêt pour la recherche du NLM (IC-K272G, IC-K275G et IC-K533G) ont tous montré un patron de migration identique au clone infectieux de type sauvage. Cependant le crosslink n'a pas été optimal puisque l'immunobuvardage a montré beaucoup de protéines VP2 sous forme de monomère. Le même résultat a été obtenu par le groupe du Dr Almendral, lors de leurs études sur les trimères du protoparvovirus MVM (Riolobos *et al.*, 2006). Les liens obtenus lors du crosslink avec le DMS sont faits à partir des groupes amines sur les protéines. Il est possible que ce type de lien ne soit pas très efficace sur les trimères de protéines de la capsid des parvovirus. Nous avons tenté un gel natif pour observer les trimères directement après le lysat cellulaire. Cependant, le signal obtenu n'était pas assez clair pour tirer des conclusions définitives. Nous avons tout de même observé des bandes semblables pour les mutants et le clone infectieux de type sauvage, appuyant les résultats obtenus lors du crosslink.

Comme il y a beaucoup plus de VP2 que de VP1 synthétisée lors de l'infection, les trimères sont composés soit de trois protéines VP2 ou deux protéines VP2 en association avec une protéine VP1. La présence de ces deux trimères a été observée lors d'expérience utilisant un « crosslink » chimique (Riolobos *et al.*, 2006). La taille des complexes obtenus était compatible avec des trimères de trois VP2 ou de VP2-VP2-VP1. De plus, avec le MVM, certains trimères dans lesquels le signal structural a été muté pouvaient être transportés au noyau, suggérant un transport par les NLS de VP1 (Lombardo *et al.*, 2000). Dans notre cas, nous avons observé peu de différence entre la localisation de VP2 pour les clones infectieux portant des substitutions de résidus basiques des NLM potentiels en comparaison avec les mêmes clones infectieux auxquels les substitutions inactivant les NLS a été ajoutée (2^e article, figure 6). Cependant, bien que les proportions VP2 :VP1 pour le MVM est de 5 :1, ce rapport, chez le PPV, semble plutôt de 10 :1, expliquant le plus faible transport de VP2 muté au noyau par VP1.

Certaines protéines nucléaires possèdent des NLS relativement pauvres en acides aminés basiques, comme la protéine VP19C du virus herpès simplex 1 (Y. Li *et al.*, 2012). La séquence NLS identifiée est non classique : PRGSGPRRAAST. Un autre exemple de protéine avec un NLS comportant peu d'acides aminés basique est la protéine cellulaire TFIP11 : VKDKFN (Tannukit *et al.*, 2009). Il serait intéressant d'étudier la structure tridimensionnelle de ces protéines afin de vérifier si d'autres acides aminés basiques sont situés à proximité, et pourrait faire partie d'un NLM.

Un autre exemple intéressant de motif de transport pour lequel le repliement de la protéine est important est le NLS de la protéine P du virus de la rage (Pasdeloup *et al.*, 2005). La séquence importante pour le transport au noyau comprend une courte séquence basique (211-KKYK-214) mais dépend aussi de l'arginine 260, qui se situe à proximité dans la structure tridimensionnelle de la protéine. Ainsi, une mutation ponctuelle substituant l'arginine 260 en alanine est suffisante pour que la protéine soit retenue au cytoplasme (Pasdeloup *et al.*, 2005). De plus, la protéine BGLF4 du virus

Epstein Barr contient aussi un NLS dépendant de la structure de la protéine (Chang *et al.*, 2012). En effet, la portion C-terminale de la protéine ne contient pas de région riche en acides aminés basiques, mais sa délétion prévient le transport au noyau de la protéine. De plus, ce NLS non classique peut se lier directement aux nucléoporines Nup62 et Nup153. Il serait intéressant, pour le PPV, de déterminer les protéines cellulaires qui peuvent interagir avec les NLS de VP1 et le NLM commun aux deux protéines.

5.2.3 Régulation temporelle des signaux de transport nucléo-cytoplasmiques

Globalement, la coordination de l'exposition des signaux de transport nucléo-cytoplasmique est hautement régulée chez les parvovirus et le PPV ne fait pas exception. Lors de la synthèse des protéines de la capsid, leur assemblage en trimère est requis pour former le NLM, essentiel au transport des trimères de VP2 au noyau (Figure 5.1 A, page suivante). Après leur transport au noyau, les trimères s'assemblent en capsid, et à ce moment autant les NLM que les NLS se retrouvent à l'intérieur de la capsid (Figure 5.1 B). L'insertion du génome dans la capsid provoque l'externalisation de la région N-terminale de VP2, comprenant des régions importantes pour l'export du noyau (Figure 5.1 C). Ainsi, seules les capsides complètes sont exportées du noyau et ultimement de la cellule, et ce, bien avant l'apparition des effets cytopathiques et la mort cellulaire. Lors de l'infection d'une cellule adjacente, et plus précisément dans la voie endosomale, la région N-terminale de VP2 sera clivée, créant de l'espace dans le pore et permettant l'externalisation de la région N-terminale de VP1 (Figure 5.1 D). Cette région unique de VP1 est essentielle pour l'évasion de la voie endosomale (PLA₂) et pour favoriser le transport de la capsid vers le noyau (NLS).

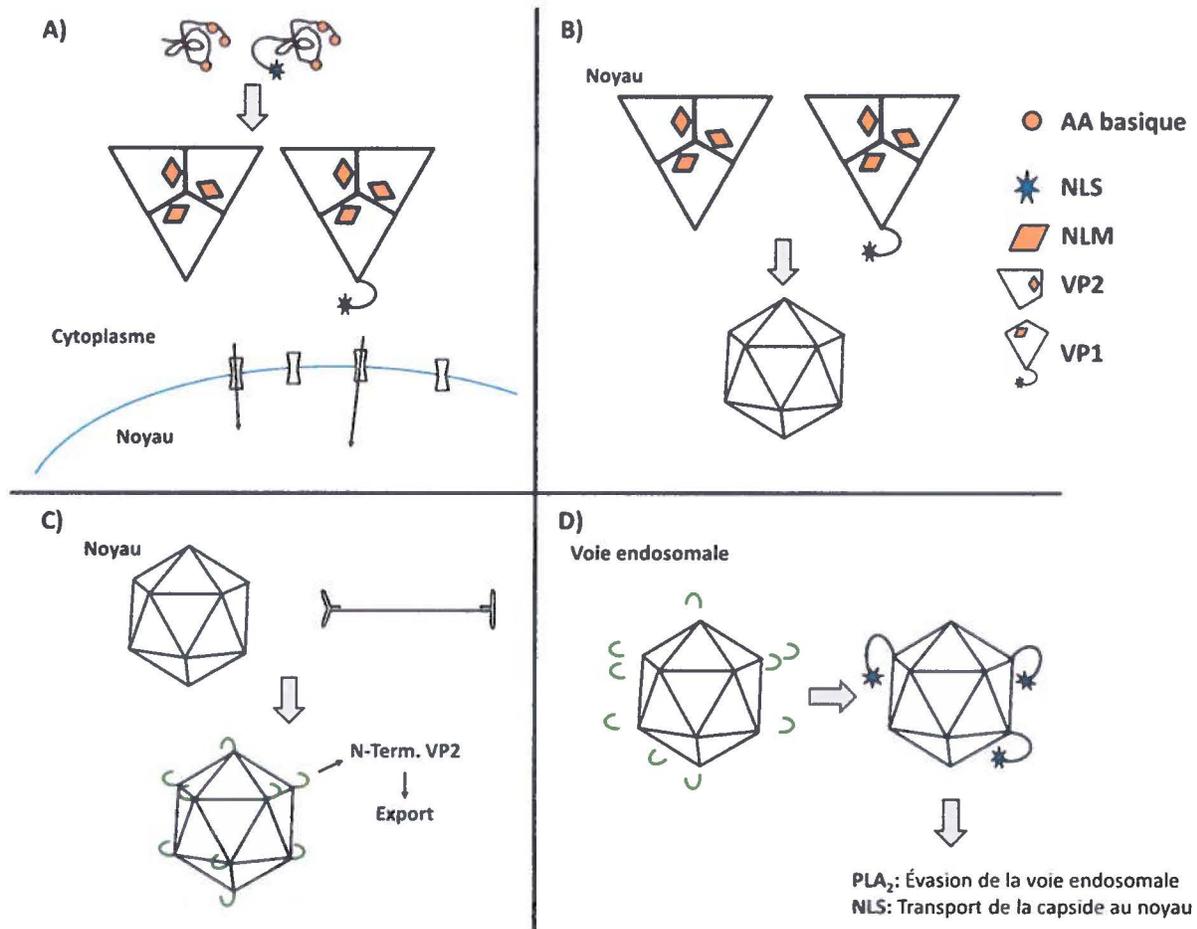


Figure 5.1. Régulation temporelle de l'exposition des signaux d'import/export des protéines de la capside
 Les protéines de la capside contiennent plusieurs régions importantes pour le transport nucléocytoplasmique. D'abord, lors de leur synthèse, les protéines contiennent des résidus basiques (orange) situés loin les uns des autres (A, haut). L'assemblage en trimère rapproche ces résidus, formant le motif de localisation nucléaire (NLM). En plus du NLM, les trimères qui incluent la protéine VP1 possèdent deux NLS actifs (étoile bleue) dans la région N-terminale unique de VP1. Les NLM et NLS peuvent être utilisés pour transporter les trimères au noyau. Une fois au noyau, les trimères s'assemblent en capside (B). À cette étape les NLM et les NLS se retrouvent dissimulés à l'intérieur de la capside. Le génome est inséré à l'intérieur des capsides (C), provoquant l'externalisation de la région N-terminale de VP2 (vert). Cette région est importante pour l'export des virions complets. L'infection d'une cellule adjacente permet le retrait de la région N-terminale de VP2 dans la voie endosomale (D). Ce clivage de VP2 crée de l'espace dans le pore de l'axe de symétrie 5', permettant l'externalisation de la région N-terminale de VP1. Cette région est doublement importante puisqu'elle contient l'activité enzymatique PLA₂, permettant l'évasion de la voie endosomale, et les NLS, permettant de cibler le virus vers le noyau.

5.3 Importance de l'expression rapide et efficace de la protéine NS1

Lors du cycle de réplication des parvovirus, l'expression de la protéine non structurale NS1 est souvent utilisée comme indicateur d'infection productive. En effet, les étapes menant à son expression dépendent essentiellement des facteurs cellulaires. Une fois le génome livré au noyau, les parvovirus ont besoin du passage dans la phase S du cycle cellulaire, de la polymérase delta et de ses cofacteurs pour convertir leur génome d'ADN simple brin en un génome double brin (Bashir *et al.*, 2000). Cette conversion permet le début de l'expression des gènes viraux, et donc la production de la protéine NS1. Une fois présente, la protéine NS1 peut exercer ses fonctions pour la réplication du génome viral, et l'expression des protéines virales, entre autres.

5.3.1 Expression de NS1 dans les cellules porcines

Des travaux précédents dans notre laboratoire ont montré que la réplication de la souche virale Kresse en culture cellulaire est environ 10 fois moins productive que la réplication avec la souche NADL-2 (Fernandes *et al.*, 2011). De plus, malgré la forte production d'ADN double brin peu importe la souche (3^e article, figure 2), l'amplification du génome, déterminée par PCR quantitatif, est retardée lors de l'infection par la souche Kresse (3^e article, figure 4). Nous avons donc établi comme troisième objectif de recherche d'évaluer l'efficacité de l'expression de NS1 selon la souche de PPV.

Nous avons montré que l'expression de NS1 est retardée lors de l'infection par Kresse comparativement à NADL-2 dans des cellules porcines (3^e article, figure 3 A, C) et efficace dans environ la moitié des cellules (3^e article, figure 3 D). En effet, lors des expériences d'IF, nous avons observé que l'apparition de NS1 se fait d'abord sous forme ponctuelle dans le noyau, et augmente dans le temps. Vers la fin de l'infection, la protéine NS1 est présente partout dans le noyau, à l'exception du nucléole (Annexe I, figure 4). En comparant l'infection par les deux souches, nous avons observé que l'expansion du marquage de NS1 est plus lente lors de l'infection par Kresse. Ainsi,

nous obtenons l'intensité du marquage obtenu à 12 h p.i. par NADL-2 seulement à 16h p.i. pour Kresse. Ceci pourrait expliquer le retard dans l'amplification du génome et ultimement la production plus faible de particules infectieuses.

5.3.2 Expression de NS1 dans une lignée cellulaire bovine

Des travaux réalisés précédemment dans le laboratoire ont permis de générer des lignées cellulaires bovines qui sont différentes dans leurs capacités à répliquer le PPV. Ces lignées ont été établies à partir d'une lignée primaire non homogène bovine. Les cellules ont été immortalisées par transfection de l'antigène grand T de SV40, et clonées par dilutions limites. Ceci a permis d'isoler des populations cellulaires distinctes.

Parmi ces lignées cellulaires, la lignée G11 était plus intéressante puisqu'elle permet une bonne réplication de la souche NADL-2 du PPV mais très peu de réplication de la souche Kresse. C'était donc un bon modèle pour évaluer si l'expression de NS1 était une étape critique dans des cellules non hôtes. Nous avons observé une faible expression de NS1 dans une lignée cellulaire semi-permissive bovine (cellules G11, 3^e article, figure 3 B, E), démontrant que l'expression de NS1 est un bon indicateur précoce de l'efficacité de la réplication du PPV. Ceci suggère aussi que les étapes précoces de l'infection sont des étapes critiques dans des lignées cellulaires non hôte. De façon intéressante, nous avons observé que les différences entre la réplication dans les cellules porcines et les cellules bovines s'amplifient à chaque étape. En effet, la comparaison des différentes étapes de réplication pour la souche NADL-2 dans les deux lignées cellulaires le montre bien. On observe que l'infection par NADL-2 dans les cellules porcines mène à une production de NS1 20 fois plus efficace que dans les cellules bovines. Par la suite, l'amplification du génome viral est 50 fois plus efficace dans les cellules porcines que les cellules bovines. Ultimement, la production de virus infectieux dans le surnageant est 1000 fois plus efficace dans les cellules porcines que bovines. Cette amplification de la restriction est encore plus évidente avec la souche Kresse. Dans les cellules porcines, la production de NS1 est 20 fois plus efficace,

l'amplification du génome 500 fois plus efficace et la production de virus dans le surnageant 10 000 fois plus efficace. Comme la protéine NS1 est importante lors de la plupart des étapes de la réplication virale, cette amplification des différences est attendue si la production de NS1 est moins efficace dès le départ.

Il est fort probable qu'une limitation dans la production de NS1 ait des effets importants sur toutes les étapes subséquentes de l'infection. Cependant, puisque nous observons une différence plus importante lors de l'infection par Kresse, nous croyons que l'infection des cellules non hôtes est restreinte à plusieurs niveaux de l'infection. Il serait maintenant très intéressant d'étudier les contreparties cellulaires impliquées dans la restriction de la réplication dans les cellules bovines. Il est possible que des interactions entre les protéines virales et des protéines cellulaires soient moins efficaces dans les cellules bovines. Il est aussi possible que certains facteurs cellulaires soient exprimés en plus faibles quantités dans une ou l'autre lignée cellulaire. Le métabolisme global des cellules peut aussi être différent et si les cellules porcines sont globalement plus actives, il est possible que les nutriments, facteurs de réplication, nucléotides, acides aminés soient plus biodisponibles pour le virus dans cette lignée.

5.3.3 Implication du taux d'expression de NS1 pour le cycle de réplication virale

Nous ne savons pas, pour le moment, si la différence dans l'expression de NS1 se situe au niveau de la transcription, de la traduction, ou bien si l'apparition de l'ADN double brin est à la base retardée lors de l'infection par cette souche. De plus, la livraison du génome au noyau est connue pour être peu efficace, et l'entrée au noyau du génome seulement ou de la capsidie entière est controversée (Bartlett *et al.*, 2000, Lux *et al.*, 2005, Sonntag *et al.*, 2006). Il serait important d'évaluer avec une méthode plus sensible et en cinétique l'apparition de l'ADN double brin afin de déterminer si le problème se situe au niveau de la conversion du génome ou bien réellement de l'expression de NS1. Ensuite, il serait intéressant de vérifier l'efficacité de la transcription en dosant la quantité d'ARNm de NS1 par RT-PCR quantitatif. Il est aussi possible qu'il y ait une différence dans la stabilité de l'ARNm entre les deux souches.

Nous avons aussi utilisé des virus chimères, dans lesquels des fragments du génome ont été échangés entre les deux souches virales. Il est intéressant de noter que la chimère de Kresse contenant le gène des protéines structurales de NADL-2 est presque aussi efficace que NADL-2 pour produire la protéine NS1. La séquence protéique de NS1 n'est pas différente entre les deux souches. Les différences se situent seulement dans l'ARNm (Introduction, figure 1.7 ; 3^e article, figure 6A ; (Bergeron *et al.*, 1996)). Il est possible que ces changements influencent la stabilité ou l'efficacité de traduction. Il est aussi possible que ces changements, qui affectent la séquence des protéines structurales, influencent les étapes précoces de l'infection et la livraison du génome au noyau.

Il faut aussi considérer le fait que notre étude a été effectuée dans un contexte de réplication virale en culture cellulaire. Dans ce système, la souche NADL-2 a des taux de réplication plus élevés que la souche Kresse. Cependant dans un contexte *in vivo*, la souche NADL-2 n'est pas pathogène, et la souche Kresse est hautement pathogène (Choi *et al.*, 1987, Paul *et al.*, 1980). La restriction *in vivo* se situe au niveau de l'accès du virus au fœtus. En effet, si la femelle est infectée avec une souche non pathogène, le virus ne se rend pas au fœtus. Cependant, si la souche NADL-2 est injectée *intra utéro*, le fœtus sera infecté et tué s'il n'est pas immunocompétent (Mengeling *et al.*, 1984). On ne sait pas pourquoi les souches non pathogènes ne passent pas de la mère au fœtus. Une possibilité est que la forte réplication d'une souche comme NADL-2 au début de l'infection active plus efficacement la réponse immunitaire, menant à l'élimination du virus avant qu'il ne puisse se rendre au fœtus. Les souches pathogènes comme Kresse, se répliquant moins efficacement, pourraient être moins bien reconnues et moins efficaces pour activer la réponse immunitaire. On sait qu'il faut environ deux semaines pour que l'infection passe de la femelle au fœtus (Zimmerman, 2012). Ceci suppose que ce que l'on observe en culture cellulaire reflète bien ce qui se passe *in vivo*.

D'un autre côté, il est possible que l'efficacité de la réplication virale dépende du type cellulaire et il serait intéressant de comparer la réplication dans plusieurs types de cellules porcines. De façon plus importante, il est possible que ce que nous observons *in vitro* ne représente pas parfaitement l'infection *in vivo*. Il se pourrait que les souches pathogènes comme Kresse se répliquent mieux que NADL-2 *in vivo*, contrairement à ce qui est observé *in vitro*. Il serait donc intéressant de comparer les souches dans un contexte *in vivo*, au niveau de la femelle infectée, afin de vérifier quelle souche se réplique mieux, et s'il y a des différences dans la réponse immunitaire. Quoiqu'il en soit ces travaux sont, à notre connaissance, la première démonstration que l'expression de la protéine multifonctionnelle NS1 est différente entre deux souches quasi identiques de parvovirus.

D'autres travaux ont été effectués concernant l'impact des protéines non structurales sur la réplication virale. Chez le virus influenza, une co-infection peut mener à l'échange de fragments de génome et à l'apparition de nouvelles souches virales. Par exemple, un virus H7N1 dans lequel on a introduit le segment de la protéine NS1 d'un virus H5N1 devient plus virulent (Ma *et al.*, 2010). Le virus modifié avait une plus forte expression de NS1, qui permettait de mieux inhiber les défenses cellulaires par l'interféron. Dans le même ordre d'idée, les protéines NS1 et NS2 du virus respiratoire syncytial (RSV) étaient importantes pour contrer les réponses cellulaires via l'interféron (Bossert *et al.*, 2002). La comparaison des protéines NS des virus humains et bovins a montré que les niveaux de protections étaient différents selon le virus et selon le type cellulaire. Ces travaux ont montré que les différences entre les protéines non structurales peuvent influencer le tropisme du virus.

CONCLUSION

Ces travaux ont révélé plusieurs nouveaux éléments concernant les interactions entre le parvovirus porcine et la cellule hôte. Nous avons identifié plusieurs composantes cellulaires importantes pour les étapes précoces de l'infection. Nous avons identifié la macropinocytose comme un mode d'entrée important pour le PPV. C'est le premier parvovirus pour lequel on montre l'utilisation d'un mode d'entrée non spécifique. Ceci peut expliquer pourquoi le PPV est capable d'entrer dans plusieurs types de cellules non porcines, même s'il n'y a pas de réplication productive. Ce mode d'entrée a aussi été identifié comme étant important pour l'entrée de virus sous la forme d'agrégats, formés naturellement lors de l'infection. Une fois dans la cellule, la voie endosomale ainsi que son acidification sont essentielles pour le PPV. Suite aux changements de conformation induits, le virus peut s'échapper de la voie endosomale et poursuivre son chemin vers le noyau. Le transport implique autant les microtubules que l'actine. Nous avons aussi montré que le protéasome est important pour l'infection, et une co-immunoprécipitation a suggéré l'ubiquitination des protéines de la capsid. Il serait maintenant intéressant de déterminer à quel niveau l'ubiquitination et le protéasome jouent un rôle dans l'infection.

Pour notre second objectif, nous avons identifié les régions importantes pour le transport des protéines de la capsid au noyau. Nous avons montré que la région unique de VP1 possède deux NLS actifs, soit un NLS actif de plus que ses proches parents le MVM et le CPV. De plus, le transport au noyau des trimères de VP2 dépend d'un motif plus complexe que celui qui a été identifié pour MVM et CPV. Le motif pour le PPV comprend deux des acides aminés importants pour MVM et CPV (K533 et R535), mais aussi d'autres résidus en dehors du feuillet- β (K272, K275, K487G, R576G). Nous avons aussi montré qu'il est possible d'utiliser des cellules non permissives à l'infection pour les expériences de transfection. Les cellules Cos-7 peuvent être transfectées avec un fort pourcentage d'efficacité et l'utilisation du clone infectieux permet la production de virions infectieux dans le surnageant de transfection. Ce nouveau système pourra

être utilisé dans le futur pour étudier les mutants qui ne produisent pas de particules infectieuses. De plus, il serait aussi fort intéressant d'étudier plus en détail l'export des capsides lors de l'infection tardive. En effet, les trois sérines en position N-terminale de VP2 du virus MVM sont importantes pour l'export des capsides. Le PPV contient seulement une sérine en position N-terminale. L'export du PPV procède donc peut-être par un mécanisme différent que le MVM.

Notre troisième objectif consistait à évaluer les différences dans l'expression de la protéine non structurale multifonctionnelle NS1 entre deux souches du PPV autant dans les cellules porcines que dans des cellules semi-permissives. Nous avons montré pour la première fois que la souche Kresse qui produit 10 fois moins de virus infectieux que la souche NADL-2 exprime NS1 plus tardivement, et en moins grande quantité. Dans le même ordre d'idée, l'expression de NS1 est très limitée dans la lignée semi-permissive bovine G11. À notre connaissance, nos travaux représentent la première description d'une différence dans les taux d'expression de NS1 selon différentes souches virales chez les parvovirus. Il serait maintenant intéressant d'évaluer de manière plus précise la cinétique d'apparition de l'ADN double brin afin de vérifier si le retard de la réplication virale provient directement de l'étape de l'expression de NS1 ou bien si des étapes plus précoces sont impliquées.

Finalement, bien que la vaccination permette de contrôler les problèmes de reproduction causés par le parvovirus porcin dans les fermes, très peu d'information sur la biologie du virus était disponible lors du début de ce projet de recherche. Nous avons enrichi les connaissances à plusieurs niveaux. De plus, les différences mises à jour entre le PPV et ses proches parents ouvrent la voie à de nouvelles recherches puisque ces résultats montrent que, malgré les ressemblances entre les virus du même genre, des différences notables peuvent exister.

RÉFÉRENCES

- Adeyemi RO & Pintel DJ (2012) Replication of minute virus of mice in murine cells is facilitated by virally induced depletion of p21. *J Virol* 86(15):8328-8332
- Agbandje-McKenna M, Llamas-Saiz AL, Wang F, Tattersall P & Rossmann MG (1998) Functional implications of the structure of the murine parvovirus, minute virus of mice. *Structure* 6(11):1369-1381
- Anouja F, Wattiez R, Mousset S & Caillet-Fauquet P (1997) The cytotoxicity of the parvovirus minute virus of mice nonstructural protein NS1 is related to changes in the synthesis and phosphorylation of cell proteins. *J Virol* 71(6):4671-4678
- Antoine M, Reimers K, Wirz W, Gressner AM, Muller R & Kiefer P (2005) Identification of an unconventional nuclear localization signal in human ribosomal protein S2. *Biochemical and biophysical research communications* 335(1):146-153
- Ball-Goodrich LJ & Tattersall P (1992) Two amino acid substitutions within the capsid are coordinately required for acquisition of fibrotropism by the lymphotropic strain of minute virus of mice. *J Virol* 66(6):3415-3423
- Bantel-Schaal U, Braspenning-Wesch I & Kartenbeck J (2009) Adeno-associated virus type 5 exploits two different entry pathways in human embryo fibroblasts. *J Gen Virol* 90(Pt 2):317-322
- Bar S, Daeffler L, Rommelaere J & Nuesch JP (2008) Vesicular egress of non-enveloped lytic parvoviruses depends on gelsolin functioning. *PLoS Pathog* 4(8):e1000126
- Bar S, Rommelaere J & Nuesch JP (2013) Vesicular transport of progeny parvovirus particles through ER and Golgi regulates maturation and cytolysis. *PLoS Pathog* 9(9):e1003605
- Barrett LW, Fletcher S & Wilton SD (2012) Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69(21):3613-3634
- Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116(2):281-297
- Bartlett JS, Wilcher R & Samulski RJ (2000) Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J Virol* 74(6):2777-2785
- Barton ES, Connolly JL, Forrest JC, Chappell JD & Dermody TS (2001) Utilization of sialic acid as a coreceptor enhances reovirus attachment by multistep adhesion strengthening. *J Biol Chem* 276(3):2200-2211
- Bashir T, Horlein R, Rommelaere J & Willwand K (2000) Cyclin A activates the DNA polymerase delta -dependent elongation machinery in vitro: A parvovirus DNA replication model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(10):5522-5527
- Bergeron J, Hebert B & Tijssen P (1996) Genome organization of the Kresse strain of porcine parvovirus: identification of the allotropic determinant and comparison with those of NADL-2 and field isolates. *J Virol* 70(4):2508-2515

- Bergeron J, Menezes J & Tijssen P (1993) Genomic organization and mapping of transcription and translation products of the NADL-2 strain of porcine parvovirus. *Virology* 197(1):86-98
- Bishop NE (2003) Dynamics of endosomal sorting. *Int Rev Cytol* 232:1-57
- Blackburn SD, Cline SE, Hemming JP & Johnson FB (2005) Attachment of bovine parvovirus to O-linked alpha 2,3 neuraminic acid on glycophorin A. *Arch Virol* 150(7):1477-1484
- Bleker S, Sonntag F & Kleinschmidt JA (2005) Mutational analysis of narrow pores at the fivefold symmetry axes of adeno-associated virus type 2 capsids reveals a dual role in genome packaging and activation of phospholipase A2 activity. *J Virol* 79(4):2528-2540
- Boisvert M, Fernandes S & Tijssen P (2010) Multiple pathways involved in porcine parvovirus cellular entry and trafficking toward the nucleus. *J Virol* 84(15):7782-7792
- Boisvert M & Tijssen P (2012) Endocytosis of non-enveloped DNA viruses. *Molecular Regulation of Endocytosis*, Brian C (Édit.) InTech. p 217-246.
- Bossert B & Conzelmann KK (2002) Respiratory syncytial virus (RSV) nonstructural (NS) proteins as host range determinants: a chimeric bovine RSV with NS genes from human RSV is attenuated in interferon-competent bovine cells. *J Virol* 76(9):4287-4293
- Bourguignon GJ, Tattersall PJ & Ward DC (1976) DNA of minute virus of mice: self-priming, nonpermuted, single-stranded genome with a 5'-terminal hairpin duplex. *J Virol* 20(1):290-306
- Brandenburger A, Legendre D, Avalosse B & Rommelaere J (1990) NS-1 and NS-2 proteins may act synergistically in the cytopathogenicity of parvovirus MVMp. *Virology* 174(2):576-584
- Brown KE, Anderson SM & Young NS (1993) Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science* 262(5130):114-117
- Burke JE & Dennis EA (2009) Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *Journal of lipid research* 50 Suppl:S237-242
- Burnette DT, Manley S, Sengupta P, Sougrat R, Davidson MW, Kachar B & Lippincott-Schwartz J (2011) A role for actin arcs in the leading-edge advance of migrating cells. *Nat Cell Biol* 13(4):371-381
- Caillet-Fauquet P, Perros M, Brandenburger A, Spegelaere P & Rommelaere J (1990) Programmed killing of human cells by means of an inducible clone of parvoviral genes encoding non-structural proteins. *EMBO J* 9(9):2989-2995
- Canaan S, Zadori Z, Ghomashchi F, Bollinger J, Sadilek M, Moreau ME, Tijssen P & Gelb MH (2004) Interfacial enzymology of parvovirus phospholipases A2. *J Biol Chem* 279(15):14502-14508
- Carroll SM, Higa HH & Paulson JC (1981) Different cell-surface receptor determinants of antigenically similar influenza virus hemagglutinins. *J Biol Chem* 256(16):8357-8363
- Castellanos M, Perez R, Rodriguez-Huete A, Grueso E, Almendral JM & Mateu MG (2013) A slender tract of glycine residues is required for translocation of the VP2 protein N-

- terminal domain through the parvovirus MVM capsid channel to initiate infection. *Biochem J* 455(1):87-94
- Chang CW, Lee CP, Huang YH, Yang PW, Wang JT & Chen MR (2012) Epstein-Barr virus protein kinase BGLF4 targets the nucleus through interaction with nucleoporins. *J Virol* 86(15):8072-8085
- Chapman MS & Agbandje M (2006) Atomic structure of viral particles. *Parvoviruses*, Kerr JR, Cotmore JM, Bloom ME, Linden MR & Parrish CR (Édit.) Hodder Arnold London, U.K. p 107-123.
- Chiorini JA (2006) Looking down the rabbit hole: understanding the binding, entry, and trafficking patterns of AAV particles in the cell. *Parvoviruses*, Kerr JR, Cotmore, S.F., Bloom M.E., Linden, R. M., Parrish, C. R. (Édit.) Hodder Arnold, London. p 165-170.
- Choi CS, Molitor TW, Joo HS & Gunther R (1987) Pathogenicity of a skin isolate of porcine parvovirus in swine fetuses. *Veterinary microbiology* 15(1-2):19-29
- Christensen J & Tattersall P (2002) Parvovirus initiator protein NS1 and RPA coordinate replication fork progression in a reconstituted DNA replication system. *J Virol* 76(13):6518-6531
- Cingolani G, Bednenko J, Gillespie MT & Gerace L (2002) Molecular basis for the recognition of a nonclassical nuclear localization signal by importin beta. *Molecular cell* 10(6):1345-1353
- Cohen S, Marr AK, Garcin P & Pante N (2011) Nuclear envelope disruption involving host caspases plays a role in the parvovirus replication cycle. *J Virol* 85(10):4863-4874
- Cohen S & Pante N (2005) Pushing the envelope: microinjection of Minute virus of mice into *Xenopus* oocytes causes damage to the nuclear envelope. *J Gen Virol* 86(Pt 12):3243-3252
- Corbau R, Duverger V, Rommelaere J & Nuesch JP (2000) Regulation of MVM NS1 by protein kinase C: impact of mutagenesis at consensus phosphorylation sites on replicative functions and cytopathic effects. *Virology* 278(1):151-167
- Cossons N, Faust EA & Zannis-Hadjopoulos M (1996) DNA polymerase delta-dependent formation of a hairpin structure at the 5' terminal palindrome of the minute virus of mice genome. *Virology* 216(1):258-264
- Cotmore SF, Agbandje-McKenna M, Chiorini JA, Mukha DV, Pintel DJ, Qiu J, Soderlund-Venermo M, Tattersall P, Tijssen P, Gatherer D & Davison AJ (2014) The family Parvoviridae. *Arch Virol* 159(5):1239-1247
- Cotmore SF, Nuesch JP & Tattersall P (1992) In vitro excision and replication of 5' telomeres of minute virus of mice DNA from cloned palindromic concatemer junctions. *Virology* 190(1):365-377
- Cotmore SF, Nuesch JP & Tattersall P (1993) Asymmetric resolution of a parvovirus palindrome in vitro. *J Virol* 67(3):1579-1589
- Cotmore SF & Tattersall P (1987) The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv Virus Res* 33:91-174

- Cotmore SF & Tattersall P (1988) The NS-1 polypeptide of minute virus of mice is covalently attached to the 5' termini of duplex replicative-form DNA and progeny single strands. *J Virol* 62(3):851-860
- Cotmore SF & Tattersall P (1989) A genome-linked copy of the NS-1 polypeptide is located on the outside of infectious parvovirus particles. *J Virol* 63(9):3902-3911
- Cotmore SF & Tattersall P (1990) Alternate splicing in a parvoviral nonstructural gene links a common amino-terminal sequence to downstream domains which confer radically different localization and turnover characteristics. *Virology* 177(2):477-487
- Cotmore SF & Tattersall P (1995) DNA replication in the autonomous parvoviruses. *Seminars in Virology* 6:271-281
- Cotmore SF & Tattersall P (2005a) Encapsidation of minute virus of mice DNA: aspects of the translocation mechanism revealed by the structure of partially packaged genomes. *Virology* 336(1):100-112
- Cotmore SF & Tattersall P (2005b) Genome packaging sense is controlled by the efficiency of the nick site in the right-end replication origin of parvoviruses minute virus of mice and LuIII. *J Virol* 79(4):2287-2300
- Cotmore SF & Tattersall P (2007) Parvoviral host range and cell entry mechanisms. *Adv Virus Res* 70:183-232
- Cutlip RC & Mengeling WL (1975) Pathogenesis of in utero infection: experimental infection of eight- and ten-week-old porcine fetuses with porcine parvovirus. *American journal of veterinary research* 36(12):1751-1754
- Daeffler L, Horlein R, Rommelaere J & Nuesch JP (2003) Modulation of minute virus of mice cytotoxic activities through site-directed mutagenesis within the NS coding region. *J Virol* 77(23):12466-12478
- Danke H, Baba T, van der Blik AM & Schmid SL (1995) Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of dynamin. *J Cell Biol* 131(1):69-80
- Damm EM, Pelkmans L, Kartenbeck J, Mezzacasa A, Kurzchalia T & Helenius A (2005) Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *J Cell Biol* 168(3):477-488
- de Jong EP, de Haan TR, Kroes AC, Beersma MF, Oepkes D & Walther FJ (2006) Parvovirus B19 infection in pregnancy. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 36(1):1-7
- Delboy MG, Roller DG & Nicola AV (2008) Cellular proteasome activity facilitates herpes simplex virus entry at a postpenetration step. *J Virol* 82(7):3381-3390
- Deleu L, Pujol A, Faisst S & Rommelaere J (1999) Activation of promoter P4 of the autonomous parvovirus minute virus of mice at early S phase is required for productive infection. *J Virol* 73(5):3877-3885
- Dennis EA (1997) The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes. *Trends in biochemical sciences* 22(1):1-2

- Douar AM, Poulard K, Stockholm D & Danos O (2001) Intracellular trafficking of adeno-associated virus vectors: routing to the late endosomal compartment and proteasome degradation. *J Virol* 75(4):1824-1833
- Drake JW & Hwang CB (2005) On the mutation rate of herpes simplex virus type 1. *Genetics* 170(2):969-970
- Driskell OJ, Mironov A, Allan VJ & Woodman PG (2007) Dynein is required for receptor sorting and the morphogenesis of early endosomes. *Nat Cell Biol* 9(1):113-120
- Dudleenamjil E, Lin CY, Dredge D, Murray BK, Robison RA & Johnson FB (2010) Bovine parvovirus uses clathrin-mediated endocytosis for cell entry. *J Gen Virol* 91(Pt 12):3032-3041
- Duffy S, Shackelton LA & Holmes EC (2008) Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nature reviews. Genetics* 9(4):267-276
- Dunne HW, Gobble JL, Hokanson JF, Kradel DC & Bubash GR (1965) Porcine reproductive failure associated with a newly identified "SMEDI" group of picorna viruses. *American journal of veterinary research* 26(115):1284-1297
- Ecker JR & Davis RW (1986) Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(15):5372-5376
- Eichwald V, Daeffler L, Klein M, Rommelaere J & Salome N (2002) The NS2 proteins of parvovirus minute virus of mice are required for efficient nuclear egress of progeny virions in mouse cells. *J Virol* 76(20):10307-10319
- Elferink JG (1979) Chlorpromazine inhibits phagocytosis and exocytosis in rabbit polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Pharmacol* 28(7):965-968
- Engelsma D, Valle N, Fish A, Salome N, Almendral JM & Fornerod M (2008) A supraphysiological nuclear export signal is required for parvovirus nuclear export. *Mol Biol Cell* 19(6):2544-2552
- Falcone S, Cocucci E, Podini P, Kirchhausen T, Clementi E & Meldolesi J (2006) Macropinocytosis: regulated coordination of endocytic and exocytic membrane traffic events. *J Cell Sci* 119(Pt 22):4758-4769
- Farr GA, Cotmore SF & Tattersall P (2006) VP2 cleavage and the leucine ring at the base of the fivefold cylinder control pH-dependent externalization of both the VP1 N terminus and the genome of minute virus of mice. *J Virol* 80(1):161-171
- Farr GA, Zhang LG & Tattersall P (2005) Parvoviral virions deploy a capsid-tethered lipolytic enzyme to breach the endosomal membrane during cell entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(47):17148-17153
- Fay N & Pante N (2013) The intermediate filament network protein, vimentin, is required for parvoviral infection. *Virology* 444(1-2):181-190
- Fernandes S, Boisvert M, Szelei J & Tijssen P (2014) Differential replication of two porcine parvovirus strains in bovine cell lines ensues from initial DNA processing and NS1 expression. *J Gen Virol* 95(Pt 4):910-921

- Fernandes S, Boisvert M & Tijssen P (2011) Genetic elements in the VP region of porcine parvovirus are critical to replication efficiency in cell culture. *J Virol* 85(6):3025-3029
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE & Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669):806-811
- Flynt AS & Lai EC (2008) Biological principles of microRNA-mediated regulation: shared themes amid diversity. *Nature reviews. Genetics* 9(11):831-842
- Gardiner EM & Tattersall P (1988) Evidence that developmentally regulated control of gene expression by a parvoviral allotropic determinant is particle mediated. *J Virol* 62(5):1713-1722
- Geoffroy MC & Salvetti A (2005) Helper functions required for wild type and recombinant adeno-associated virus growth. *Current gene therapy* 5(3):265-271
- Gerasimenko JV, Tepikin AV, Petersen OH & Gerasimenko OV (1998) Calcium uptake via endocytosis with rapid release from acidifying endosomes. *Curr Biol* 8(24):1335-1338
- Gomez Corredor A & Archambault D (2009) The bovine immunodeficiency virus rev protein: identification of a novel lentiviral bipartite nuclear localization signal harboring an atypical spacer sequence. *J Virol* 83(24):12842-12853
- Govindasamy L, Hueffer K, Parrish CR & Agbandje-McKenna M (2003) Structures of host range-controlling regions of the capsids of canine and feline parvoviruses and mutants. *J Virol* 77(22):12211-12221
- Grassmann R & Jeang KT (2008) The roles of microRNAs in mammalian virus infection. *Biochimica et biophysica acta* 1779(11):706-711
- Greber UF & Way M (2006) A superhighway to virus infection. *Cell* 124(4):741-754
- Greber UF, Willetts M, Webster P & Helenius A (1993) Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* 75(3):477-486
- Grieger JC, Snowdy S & Samulski RJ (2006) Separate basic region motifs within the adeno-associated virus capsid proteins are essential for infectivity and assembly. *J Virol* 80(11):5199-5210
- Griffiths SJ, Koegl M, Boutell C, Zenner HL, Crump CM, Pica F, Gonzalez O, Friedel CC, Barry G, Martin K, Craigon MH, Chen R, Kaza LN, Fossum E, Fazakerley JK, Efsthathiou S, Volpi A, Zimmer R, Ghazal P & Haas J (2013) A systematic analysis of host factors reveals a Med23-interferon-lambda regulatory axis against herpes simplex virus type 1 replication. *PLoS Pathog* 9(8):e1003514
- Hansen & Nichols BJ (2009) Molecular mechanisms of clathrin-independent endocytosis. *J Cell Sci* 122(Pt 11):1713-1721
- Hansen J, Qing K & Srivastava A (2001) Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: altered endocytic processing enhances transduction efficiency in murine fibroblasts. *J Virol* 75(9):4080-4090
- Hanson ND & Rhode SL, 3rd (1991) Parvovirus NS1 stimulates P4 expression by interaction with the terminal repeats and through DNA amplification. *J Virol* 65(8):4325-4333

- Harbison CE, Chiorini JA & Parrish CR (2008) The parvovirus capsid odyssey: from the cell surface to the nucleus. *Trends Microbiol* 16(5):208-214
- Harbison CE, Lyi SM, Weichert WS & Parrish CR (2009) Early steps in cell infection by parvoviruses: host-specific differences in cell receptor binding but similar endosomal trafficking. *J Virol* 83(20):10504-10514
- Harding MJ & Molitor TW (1992) A monoclonal antibody which recognizes cell surface antigen and inhibits porcine parvovirus replication. *Arch Virol* 123(3-4):323-333
- Hardt N, Dinsart C, Spadari S, Pedrali-Noy G & Rommelaere J (1983) Interrelation between viral and cellular DNA synthesis in mouse cells infected with the parvovirus minute virus of mice. *J Gen Virol* 64 (Pt 9):1991-1998
- Hendil KB & Hartmann-Petersen R (2004) Proteasomes: a complex story. *Current protein & peptide science* 5(3):135-151
- Herrmann H, Bar H, Kreplak L, Strelkov SV & Aebi U (2007) Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(7):562-573
- Hicke L (2001) Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(3):195-201
- Hoelzer K & Parrish CR (2010) The emergence of parvoviruses of carnivores. *Vet Res* 41(6):39
- Hoelzer K, Shackelton LA, Parrish CR & Holmes EC (2008) Phylogenetic analysis reveals the emergence, evolution and dispersal of carnivore parvoviruses. *J Gen Virol* 89(Pt 9):2280-2289
- Hueffer K, Govindasamy L, Agbandje-McKenna M & Parrish CR (2003a) Combinations of two capsid regions controlling canine host range determine canine transferrin receptor binding by canine and feline parvoviruses. *J Virol* 77(18):10099-10105
- Hueffer K, Palermo LM & Parrish CR (2004) Parvovirus infection of cells by using variants of the feline transferrin receptor altering clathrin-mediated endocytosis, membrane domain localization, and capsid-binding domains. *J Virol* 78(11):5601-5611
- Hueffer K, Parker JS, Weichert WS, Geisel RE, Sgro JY & Parrish CR (2003b) The natural host range shift and subsequent evolution of canine parvovirus resulted from virus-specific binding to the canine transferrin receptor. *J Virol* 77(3):1718-1726
- Hueffer K & Parrish CR (2003c) Parvovirus host range, cell tropism and evolution. *Current opinion in microbiology* 6(4):392-398
- Huotari J & Helenius A (2011) Endosome maturation. *EMBO J* 30(17):3481-3500
- Ihalainen TO, Niskanen EA, Jylhava J, Turpeinen T, Rinne J, Timonen J & Vihinen-Ranta M (2007) Dynamics and interactions of parvoviral NS1 protein in the nucleus. *Cell Microbiol* 9(8):1946-1959
- Ivanov AI (2008) Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to be useful? *Methods Mol Biol* 440:15-33
- Izquierdo M (2005) Short interfering RNAs as a tool for cancer gene therapy. *Cancer gene therapy* 12(3):217-227

- Jartti T, Hedman K, Jartti L, Ruuskanen O, Allander T & Soderlund-Venermo M (2012) Human bocavirus-the first 5 years. *Rev Med Virol* 22(1):46-64
- Jenkins GM, Rambaut A, Pybus OG & Holmes EC (2002) Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis. *Journal of molecular evolution* 54(2):156-165
- Johns HL, Berryman S, Monaghan P, Belsham GJ & Jackson T (2009) A dominant-negative mutant of rab5 inhibits infection of cells by foot-and-mouth disease virus: implications for virus entry. *J Virol* 83(12):6247-6256
- Johnson FB, Fenn LB, Owens TJ, Faucheux LJ & Blackburn SD (2004) Attachment of bovine parvovirus to sialic acids on bovine cell membranes. *J Gen Virol* 85(Pt 8):2199-2207
- Jones AT (2007) Macropinocytosis: searching for an endocytic identity and role in the uptake of cell penetrating peptides. *J Cell Mol Med* 11(4):670-684
- Jovic M, Sharma M, Rahajeng J & Caplan S (2010) The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histology and histopathology* 25(1):99-112
- Jozwik A, Manteufel J, Selbitz HJ & Truyen U (2009) Vaccination against porcine parvovirus protects against disease, but does not prevent infection and virus shedding after challenge infection with a heterologous virus strain. *J Gen Virol* 90(Pt 10):2437-2441
- Kaksonen M, Toret CP & Drubin DG (2006) Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(6):404-414
- Kalderon D, Richardson WD, Markham AF & Smith AE (1984) Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature* 311(5981):33-38
- Kang BY, You H, Bandyopadhyay S, Agrawal N, Melchert RB, Basnakian AG, Liu Y & Hermonat PL (2009) Cervical cancer isolate PT3, super-permissive for adeno-associated virus replication, over-expresses DNA polymerase delta, PCNA, RFC and RPA. *BMC Microbiol* 9:79
- Kaufmann B, Bowman VD, Li Y, Szelei J, Waddell PJ, Tijssen P & Rossmann MG (2010) Structure of *Penaeus stylirostris* densovirus, a shrimp pathogen. *J Virol* 84(21):11289-11296
- Kiss AL & Botos E (2009) Endocytosis via caveolae: alternative pathway with distinct cellular compartments to avoid lysosomal degradation? *J Cell Mol Med* 13(7):1228-1237
- Kornitzer D & Ciechanover A (2000) Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation. *J Cell Physiol* 182(1):1-11
- Krady JK & Ward DC (1995) Transcriptional activation by the parvoviral nonstructural protein NS-1 is mediated via a direct interaction with Sp1. *Mol Cell Biol* 15(1):524-533
- Krauer K, Buck M, Flanagan J, Belzer D & Sculley T (2004) Identification of the nuclear localization signals within the Epstein-Barr virus EBNA-6 protein. *J Gen Virol* 85(Pt 1):165-172
- Lajoie P & Nabi IR (2007) Regulation of raft-dependent endocytosis. *J Cell Mol Med* 11(4):644-653

- Lange A, Mills RE, Lange CJ, Stewart M, Devine SE & Corbett AH (2007) Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J Biol Chem* 282(8):5101-5105
- Lecellier CH, Dunoyer P, Arar K, Lehmann-Che J, Eyquem S, Himber C, Saib A & Voinnet O (2005) A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science* 308(5721):557-560
- Leopold PL & Pfister KK (2006) Viral strategies for intracellular trafficking: motors and microtubules. *Traffic* 7(5):516-523
- Li F, Zhang Q, Yao Q, Chen L, Li J, Qiu J & Sun Y (2014) The DNA replication, virogenesis and infection of canine minute virus in non-permissive and permissive cells. *Virus Res* 179:147-152
- Li M, Wang S, Cai M & Zheng C (2011) Identification of nuclear and nucleolar localization signals of pseudorabies virus (PRV) early protein UL54 reveals that its nuclear targeting is required for efficient production of PRV. *J Virol* 85(19):10239-10251
- Li Y, Zhao L, Wang S, Xing J & Zheng C (2012) Identification of a novel NLS of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) VP19C and its nuclear localization is required for efficient production of HSV-1. *J Gen Virol* 93(Pt 9):1869-1875
- Lin & Ghosh S (1996) A glycine-rich region in NF-kappaB p105 functions as a processing signal for the generation of the p50 subunit. *Mol Cell Biol* 16(5):2248-2254
- Lin X, Ruan X, Anderson MG, McDowell JA, Kroeger PE, Fesik SW & Shen Y (2005) siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation. *Nucleic Acids Res* 33(14):4527-4535
- Lombardo E, Ramirez JC, Agbandje-McKenna M & Almendral JM (2000) A beta-stranded motif drives capsid protein oligomers of the parvovirus minute virus of mice into the nucleus for viral assembly. *J Virol* 74(8):3804-3814
- Lombardo E, Ramirez JC, Garcia J & Almendral JM (2002) Complementary roles of multiple nuclear targeting signals in the capsid proteins of the parvovirus minute virus of mice during assembly and onset of infection. *J Virol* 76(14):7049-7059
- Lopez-Bueno A, Rubio MP, Bryant N, McKenna R, Agbandje-McKenna M & Almendral JM (2006) Host-selected amino acid changes at the sialic acid binding pocket of the parvovirus capsid modulate cell binding affinity and determine virulence. *J Virol* 80(3):1563-1573
- Lorson C, Pearson J, Burger L & Pintel DJ (1998) An Sp1-binding site and TATA element are sufficient to support full transactivation by proximally bound NS1 protein of minute virus of mice. *Virology* 240(2):326-337
- Lundmark R, Doherty GJ, Howes MT, Cortese K, Vallis Y, Parton RG & McMahon HT (2008) The GTPase-activating protein GRAF1 regulates the CLIC/GEEC endocytic pathway. *Curr Biol* 18(22):1802-1808
- Lux K, Goerlitz N, Schlemminger S, Perabo L, Goldnau D, Endell J, Leike K, Kofler DM, Finke S, Hallek M & Buning H (2005) Green fluorescent protein-tagged adeno-associated virus particles allow the study of cytosolic and nuclear trafficking. *J Virol* 79(18):11776-11787

- Ma W, Brenner D, Wang Z, Dauber B, Ehrhardt C, Hogner K, Herold S, Ludwig S, Wolff T, Yu K, Richt JA, Planz O & Pleschka S (2010) The NS segment of an H5N1 highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) is sufficient to alter replication efficiency, cell tropism, and host range of an H7N1 HPAIV. *J Virol* 84(4):2122-2133
- Macara IG (2001) Transport into and out of the nucleus. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 65(4):570-594, table of contents
- Mainou BA & Dermody TS (2012) Transport to late endosomes is required for efficient reovirus infection. *J Virol* 86(16):8346-8358
- Mani B, Baltzer C, Valle N, Almendral JM, Kempf C & Ros C (2006) Low pH-dependent endosomal processing of the incoming parvovirus minute virus of mice virion leads to externalization of the VP1 N-terminal sequence (N-VP1), N-VP2 cleavage, and uncoating of the full-length genome. *J Virol* 80(2):1015-1024
- Maroto B, Valle N, Saffrich R & Almendral JM (2004) Nuclear export of the nonenveloped parvovirus virion is directed by an unordered protein signal exposed on the capsid surface. *J Virol* 78(19):10685-10694
- Martins Soares R, Cortez A, Heinemann MB, Sakamoto SM, Martins VG, Bacci M, Jr., De Campos Fernandes FM & Richtzenhain LJ (2003) Genetic variability of porcine parvovirus isolates revealed by analysis of partial sequences of the structural coding gene VP2. *J Gen Virol* 84(Pt 6):1505-1515
- May RC & Machesky LM (2001) Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 114(Pt 6):1061-1077
- Mayor S & Pagano RE (2007) Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(8):603-612
- McMahon HT & Boucrot E (2011) Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(8):517-533
- Mears WE, Lam V & Rice SA (1995) Identification of nuclear and nucleolar localization signals in the herpes simplex virus regulatory protein ICP27. *J Virol* 69(2):935-947
- Meier O & Greber UF (2004) Adenovirus endocytosis. *J Gene Med* 6 Suppl 1:S152-163
- Mengeling WL & Cutlip RC (1976) Reproductive disease experimentally induced by exposing pregnant gilts to porcine parvovirus. *American journal of veterinary research* 37(12):1393-1400
- Mengeling WL, Pejsak Z & Paul PS (1984) Biological assay of attenuated strain NADL-2 and virulent strain NADL-8 of porcine parvovirus. *American journal of veterinary research* 45(11):2403-2407
- Miller CL & Pintel DJ (2002) Interaction between parvovirus NS2 protein and nuclear export factor Crm1 is important for viral egress from the nucleus of murine cells. *J Virol* 76(7):3257-3266
- Minberg M, Gopas J & Tal J (2011) Minute virus of mice (MVMp) infection and NS1 expression induce p53 independent apoptosis in transformed rat fibroblast cells. *Virology* 412(1):233-243

- Moffatt S, Yaegashi N, Tada K, Tanaka N & Sugamura K (1998) Human parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein induces apoptosis in erythroid lineage cells. *J Virol* 72(4):3018-3028
- Moorthy AK, Savinova OV, Ho JQ, Wang VY, Vu D & Ghosh G (2006) The 20S proteasome processes NF-kappaB1 p105 into p50 in a translation-independent manner. *EMBO J* 25(9):1945-1956
- Morita E, Nakashima A, Asao H, Sato H & Sugamura K (2003) Human parvovirus B19 nonstructural protein (NS1) induces cell cycle arrest at G(1) phase. *J Virol* 77(5):2915-2921
- Moriyama T, Marquez JP, Wakatsuki T & Sorokin A (2007) Caveolar endocytosis is critical for BK virus infection of human renal proximal tubular epithelial cells. *J Virol* 81(16):8552-8562
- Mueller C & Flotte TR (2008) Clinical gene therapy using recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Ther* 15(11):858-863
- Mukhopadhyay D & Riezman H (2007) Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* 315(5809):201-205
- Muro S, Wiewrodt R, Thomas A, Koniaris L, Albelda SM, Muzykantov VR & Koval M (2003) A novel endocytic pathway induced by clustering endothelial ICAM-1 or PECAM-1. *J Cell Sci* 116(Pt 8):1599-1609
- Nam HJ, Gurda-Whitaker B, Gan WY, Ilaria S, McKenna R, Mehta P, Alvarez RA & Agbandje-McKenna M (2006) Identification of the sialic acid structures recognized by minute virus of mice and the role of binding affinity in virulence adaptation. *J Biol Chem* 281(35):25670-25677
- Niskanen EA, Ihalainen TO, Kallioliinna O, Hakkinen MM & Vihinen-Ranta M (2010) Effect of ATP binding and hydrolysis on dynamics of canine parvovirus NS1. *J Virol* 84(10):5391-5403
- Nonnenmacher M & Weber T (2011) Adeno-associated virus 2 infection requires endocytosis through the CLIC/GEEC pathway. *Cell Host Microbe* 10(6):563-576
- Norkin LC (1999) Simian virus 40 infection via MHC class I molecules and caveolae. *Immunol Rev* 168:13-22
- Nuesch JP, Bar S, Lachmann S & Rommelaere J (2009) Ezrin-radixin-moesin family proteins are involved in parvovirus replication and spreading. *J Virol* 83(11):5854-5863
- Nuesch JP, Christensen J & Rommelaere J (2001) Initiation of minute virus of mice DNA replication is regulated at the level of origin unwinding by atypical protein kinase C phosphorylation of NS1. *J Virol* 75(13):5730-5739
- Nuesch JP, Cotmore SF & Tattersall P (1995) Sequence motifs in the replicator protein of parvovirus MVM essential for nicking and covalent attachment to the viral origin: identification of the linking tyrosine. *Virology* 209(1):122-135

- Nuesch JP, Lachmann S & Rommelaere J (2005) Selective alterations of the host cell architecture upon infection with parvovirus minute virus of mice. *Virology* 331(1):159-174
- Nuesch JP & Rommelaere J (2006) NS1 interaction with CKII alpha: novel protein complex mediating parvovirus-induced cytotoxicity. *J Virol* 80(10):4729-4739
- Nuesch JP & Tattersall P (1993) Nuclear targeting of the parvoviral replicator molecule NS1: evidence for self-association prior to nuclear transport. *Virology* 196(2):637-651
- Oraveerakul K, Choi CS & Molitor TW (1992) Restriction of porcine parvovirus replication in nonpermissive cells. *J Virol* 66(2):715-722
- Pakkanen K, Salonen E, Makela AR, Oker-Blom C, Vattulainen I & Vuento M (2009) Desipramine induces disorder in cholesterol-rich membranes: implications for viral trafficking. *Physical biology* 6(4):046004
- Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL & Maniatis T (1994) The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* 78(5):773-785
- Pante N & Kann M (2002) Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol Biol Cell* 13(2):425-434
- Parker JS, Murphy WJ, Wang D, O'Brien SJ & Parrish CR (2001) Canine and feline parvoviruses can use human or feline transferrin receptors to bind, enter, and infect cells. *J Virol* 75(8):3896-3902
- Parker JS & Parrish CR (2000) Cellular uptake and infection by canine parvovirus involves rapid dynamin-regulated clathrin-mediated endocytosis, followed by slower intracellular trafficking. *J Virol* 74(4):1919-1930
- Parrish CR (2010) Structures and functions of parvovirus capsids and the process of cell infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 343:149-176
- Pasdeloup D, Poisson N, Raux H, Gaudin Y, Ruigrok RW & Blondel D (2005) Nucleocytoplasmic shuttling of the rabies virus P protein requires a nuclear localization signal and a CRM1-dependent nuclear export signal. *Virology* 334(2):284-293
- Paul PS & Mengeling WL (1980) Evaluation of a modified live-virus vaccine for the prevention of porcine parvovirus-induced reproductive disease in swine. *American journal of veterinary research* 41(12):2007-2011
- Paul PS, Mengeling WL & Brown TT, Jr. (1979) Replication of porcine parvovirus in peripheral blood lymphocytes, monocytes, and peritoneal macrophages. *Infection and immunity* 25(3):1003-1007
- Pelham HR (1990) The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. *Trends in biochemical sciences* 15(12):483-486
- Perez R, Castellanos M, Rodriguez-Huete A & Mateu MG (2011) Molecular determinants of self-association and rearrangement of a trimeric intermediate during the assembly of a parvovirus capsid. *J Mol Biol* 413(1):32-40
- Perrais D & Merrifield CJ (2005) Dynamics of endocytic vesicle creation. *Dev Cell* 9(5):581-592

- Pickart CM (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70:503-533
- Pillet S, Annan Z, Fichelson S & Morinet F (2003) Identification of a nonconventional motif necessary for the nuclear import of the human parvovirus B19 major capsid protein (VP2). *Virology* 306(1):25-32
- Porwal M, Cohen S, Snoussi K, Popa-Wagner R, Anderson F, Dugot-Senant N, Wodrich H, Dinsart C, Kleinschmidt JA, Pante N & Kann M (2013) Parvoviruses cause nuclear envelope breakdown by activating key enzymes of mitosis. *PLoS Pathog* 9(10):e1003671
- Previsani N, Fontana S, Hirt B & Beard P (1997) Growth of the parvovirus minute virus of mice MVMP3 in EL4 lymphocytes is restricted after cell entry and before viral DNA amplification: cell-specific differences in virus uncoating in vitro. *J Virol* 71(10):7769-7780
- Pujol A, Deleu L, Nuesch JP, Cziepluch C, Jauniaux JC & Rommelaere J (1997) Inhibition of parvovirus minute virus of mice replication by a peptide involved in the oligomerization of nonstructural protein NS1. *J Virol* 71(10):7393-7403
- Qiu J & Brown KE (1999) A 110-kDa nuclear shuttle protein, nucleolin, specifically binds to adeno-associated virus type 2 (AAV-2) capsid. *Virology* 257(2):373-382
- Quattrocchi S, Ruprecht N, Bonsch C, Bieli S, Zurcher C, Boller K, Kempf C & Ros C (2012) Characterization of the early steps of human parvovirus B19 infection. *J Virol* 86(17):9274-9284
- Radtke K, Dohner K & Sodeik B (2006) Viral interactions with the cytoskeleton: a hitchhiker's guide to the cell. *Cell Microbiol* 8(3):387-400
- Rappoport JZ (2008) Focusing on clathrin-mediated endocytosis. *Biochem J* 412(3):415-423
- Rhode SL, 3rd (1985a) Nucleotide sequence of the coat protein gene of canine parvovirus. *J Virol* 54(2):630-633
- Rhode SL, 3rd (1985b) trans-Activation of parvovirus P38 promoter by the 76K noncapsid protein. *J Virol* 55(3):886-889
- Rhode SL, 3rd (1989) Both excision and replication of cloned autonomous parvovirus DNA require the NS1 (rep) protein. *J Virol* 63(10):4249-4256
- Rhode SL, 3rd & Richard SM (1987) Characterization of the trans-activation-responsive element of the parvovirus H-1 P38 promoter. *J Virol* 61(9):2807-2815
- Ridpath JF & Mengeling WL (1988) Uptake of porcine parvovirus into host and nonhost cells suggests host specificity is determined by intracellular factors. *Virus Res* 10(1):17-27
- Riolobos L, Reguera J, Mateu MG & Almendral JM (2006) Nuclear transport of trimeric assembly intermediates exerts a morphogenetic control on the icosahedral parvovirus capsid. *J Mol Biol* 357(3):1026-1038
- Robbins J, Dilworth SM, Laskey RA & Dingwall C (1991) Two interdependent basic domains in nucleoplasmic nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* 64(3):615-623

- Rodeffer HE, Leman AD, Dunne HW, Cropper M & Sprecher DJ (1975) Reproductive failure in swine associated with maternal seroconversion for porcine parvovirus. *J Am Vet Med Assoc* 166(10):991-992
- Ros C, Burckhardt CJ & Kempf C (2002) Cytoplasmic trafficking of minute virus of mice: low-pH requirement, routing to late endosomes, and proteasome interaction. *J Virol* 76(24):12634-12645
- Ros C, Gerber M & Kempf C (2006) Conformational changes in the VP1-unique region of native human parvovirus B19 lead to exposure of internal sequences that play a role in virus neutralization and infectivity. *J Virol* 80(24):12017-12024
- Ros C & Kempf C (2004) The ubiquitin-proteasome machinery is essential for nuclear translocation of incoming minute virus of mice. *Virology* 324(2):350-360
- Rossmann MG & Johnson JE (1989) Icosahedral RNA virus structure. *Annu Rev Biochem* 58:533-573
- Rubio MP, Guerra S & Almendral JM (2001) Genome replication and postencapsidation functions mapping to the nonstructural gene restrict the host range of a murine parvovirus in human cells. *J Virol* 75(23):11573-11582
- Sanchez-Martinez C, Grueso E, Carroll M, Rommelaere J & Almendral JM (2012) Essential role of the unordered VP2 n-terminal domain of the parvovirus MVM capsid in nuclear assembly and endosomal enlargement of the virion fivefold channel for cell entry. *Virology* 432(1):45-56
- Sandvig K, Torgersen ML, Raa HA & van Deurs B (2008) Clathrin-independent endocytosis: from nonexisting to an extreme degree of complexity. *Histochem Cell Biol* 129(3):267-276
- Saxena L, Kumar GR, Saxena S, Chaturvedi U, Sahoo AP, Singh LV, Santra L, Palia SK, Desai GS & Tiwari AK (2013) Apoptosis induced by NS1 gene of Canine Parvovirus-2 is caspase dependent and p53 independent. *Virus Res* 173(2):426-430
- Shackelton LA & Holmes EC (2006) Phylogenetic evidence for the rapid evolution of human B19 erythrovirus. *J Virol* 80(7):3666-3669
- Shackelton LA, Parrish CR, Truyen U & Holmes EC (2005) High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(2):379-384
- Shemiakina, II, Ermakova GV, Cranfill PJ, Baird MA, Evans RA, Souslova EA, Staroverov DB, Gorokhovatsky AY, Putintseva EV, Gorodnicheva TV, Chepurnykh TV, Strukova L, Lukyanov S, Zaraisky AG, Davidson MW, Chudakov DM & Shcherbo D (2012) A monomeric red fluorescent protein with low cytotoxicity. *Nature communications* 3:1204
- Sieczkarski SB & Whittaker GR (2002a) Dissecting virus entry via endocytosis. *J Gen Virol* 83(Pt 7):1535-1545
- Sieczkarski SB & Whittaker GR (2002b) Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 76(20):10455-10464

- Simpson AA, Hebert B, Sullivan GM, Parrish CR, Zadori Z, Tijssen P & Rossmann MG (2002) The structure of porcine parvovirus: comparison with related viruses. *J Mol Biol* 315(5):1189-1198
- Sivan G, Martin SE, Myers TG, Buehler E, Szymczyk KH, Ormanoglu P & Moss B (2013) Human genome-wide RNAi screen reveals a role for nuclear pore proteins in poxvirus morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(9):3519-3524
- Sonntag F, Bleker S, Leuchs B, Fischer R & Kleinschmidt JA (2006) Adeno-associated virus type 2 capsids with externalized VP1/VP2 trafficking domains are generated prior to passage through the cytoplasm and are maintained until uncoating occurs in the nucleus. *J Virol* 80(22):11040-11054
- Spoden G, Freitag K, Husmann M, Boller K, Sapp M, Lambert C & Florin L (2008) Clathrin- and caveolin-independent entry of human papillomavirus type 16--involvement of tetraspanin-enriched microdomains (TEMs). *PloS one* 3(10):e3313
- Steinel A, Munson L, van Vuuren M & Truyen U (2000) Genetic characterization of feline parvovirus sequences from various carnivores. *J Gen Virol* 81(Pt 2):345-350
- Stewart M (2007) Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(3):195-208
- Streck AF, Bonatto SL, Homeier T, Souza CK, Goncalves KR, Gava D, Canal CW & Truyen U (2011) High rate of viral evolution in the capsid protein of porcine parvovirus. *J. Gen. Virol.* 92(Pt 11):2628-2636
- Streck AF, Homeier T, Foerster T, Fischer S & Truyen U (2013) Analysis of porcine parvoviruses in tonsils and hearts from healthy pigs reveals high prevalence and genetic diversity in Germany. *Arch Virol* 158(6):1173-1180
- Sturzenbecker LJ, Nibert M, Furlong D & Fields BN (1987) Intracellular digestion of reovirus particles requires a low pH and is an essential step in the viral infectious cycle. *J Virol* 61(8):2351-2361
- Suikkanen S, Aaltonen T, Nevalainen M, Valilehto O, Lindholm L, Vuento M & Vihinen-Ranta M (2003a) Exploitation of microtubule cytoskeleton and dynein during parvoviral traffic toward the nucleus. *J Virol* 77(19):10270-10279
- Suikkanen S, Antila M, Jaatinen A, Vihinen-Ranta M & Vuento M (2003b) Release of canine parvovirus from endocytic vesicles. *Virology* 316(2):267-280
- Suikkanen S, Saajarvi K, Hirsimaki J, Valilehto O, Reunanen H, Vihinen-Ranta M & Vuento M (2002) Role of recycling endosomes and lysosomes in dynein-dependent entry of canine parvovirus. *J Virol* 76(9):4401-4411
- Swanson JA & Watts C (1995) Macropinocytosis. *Trends Cell Biol* 5(11):424-428
- Szelei J, Zadori, Z., Tijssen, P. (2006) Porcine parvovirus. *Parvoviruses*, Kerr JR, Cotmore, S.F., Bloom M.E., Linden, R. M., Parrish, C. R. (Édit.) Hodder Arnold, London. p 435-445.
- Tannukit S, Crabb TL, Hertel KJ, Wen X, Jans DA & Paine ML (2009) Identification of a novel nuclear localization signal and speckle-targeting sequence of tuftelin-interacting protein

- 11, a splicing factor involved in spliceosome disassembly. *Biochemical and biophysical research communications* 390(3):1044-1050
- Tattersall, Kerr JR, Cotmore JM, Bloom ME, Linden MR & Parrish CR (2006) *The evolution of parvovirus taxonomy*. Hodder Arnold, London, UK,
- Tattersall & Ward DC (1976) Rolling hairpin model for replication of parvovirus and linear chromosomal DNA. *Nature* 263(5573):106-109
- Tattersall P (1972) Replication of the parvovirus MVM. I. Dependence of virus multiplication and plaque formation on cell growth. *J Virol* 10(4):586-590
- Tattersall P (2006) The evolution of parvovirus taxonomy. *Parvoviruses*, Kerr JR, Cotmore, S.F., Bloom M.E., Linden, R. M., Parrish, C. R. (Édit.) Hodder Arnold, London. p 5-14.
- Teale A, Campbell S, Van Buuren N, Magee WC, Watmough K, Couturier B, Shipclark R & Barry M (2009) Orthopoxviruses require a functional ubiquitin-proteasome system for productive replication. *J Virol* 83(5):2099-2108
- Tijssen P (1999) Molecular and structural basis of the evolution of parvovirus tropism. *Acta veterinaria Hungarica* 47(3):379-394
- Truant R & Cullen BR (1999) The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin beta-dependent nuclear localization signals. *Mol Cell Biol* 19(2):1210-1217
- Truyen U, Evermann JF, Vieler E & Parrish CR (1996) Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range. *Virology* 215(2):186-189
- Truyen U, Gruenberg A, Chang SF, Obermaier B, Veijalainen P & Parrish CR (1995) Evolution of the feline-subgroup parvoviruses and the control of canine host range in vivo. *J Virol* 69(8):4702-4710
- Truyen U & Parrish CR (1992) Canine and feline host ranges of canine parvovirus and feline panleukopenia virus: distinct host cell tropisms of each virus in vitro and in vivo. *J Virol* 66(9):5399-5408
- Tschochner H & Hurt E (2003) Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol* 13(5):255-263
- Tullis GE, Burger LR & Pintel DJ (1992) The trypsin-sensitive RVER domain in the capsid proteins of minute virus of mice is required for efficient cell binding and viral infection but not for proteolytic processing in vivo. *Virology* 191(2):846-857
- Tullis GE, Burger LR & Pintel DJ (1993) The minor capsid protein VP1 of the autonomous parvovirus minute virus of mice is dispensable for encapsidation of progeny single-stranded DNA but is required for infectivity. *J Virol* 67(1):131-141
- Vasudevacharya J & Compans RW (1992) The NS and capsid genes determine the host range of porcine parvovirus. *Virology* 187(2):515-524
- Vendeville A, Ravallec M, Jousset FX, Devise M, Mutuel D, Lopez-Ferber M, Fournier P, Dupressoir T & Ogliastro M (2009) Dengue virus infectious pathway requires clathrin-mediated endocytosis followed by trafficking to the nucleus. *J Virol* 83(9):4678-4689

- Venkatakrishnan B, Yarbrough J, Domsic J, Bennett A, Bothner B, Kozyreva OG, Samulski RJ, Muzyczka N, McKenna R & Agbandje-McKenna M (2013) Structure and dynamics of adeno-associated virus serotype 1 VP1-unique N-terminal domain and its role in capsid trafficking. *J Virol* 87(9):4974-4984
- Vihinen-Ranta, Kakkola L, Kalela A, Vilja P & Vuento M (1997) Characterization of a nuclear localization signal of canine parvovirus capsid proteins. *European journal of biochemistry / FEBS* 250(2):389-394
- Vihinen-Ranta M, Kalela A, Makinen P, Kakkola L, Marjomaki V & Vuento M (1998) Intracellular route of canine parvovirus entry. *J Virol* 72(1):802-806
- Vihinen-Ranta M, Parrish, C. R. (2006) Cell infection processes of autonomous parvoviruses. *Parvoviruses*, Kerr JR, Cotmore, S.F., Bloom M.E., Linden, R. M., Parrish, C. R. (Édit.) Hodder Arnold, London. p 157-163.
- Vihinen-Ranta M, Wang D, Weichert WS & Parrish CR (2002) The VP1 N-terminal sequence of canine parvovirus affects nuclear transport of capsids and efficient cell infection. *J Virol* 76(4):1884-1891
- Vihinen-Ranta M, Yuan W & Parrish CR (2000) Cytoplasmic trafficking of the canine parvovirus capsid and its role in infection and nuclear transport. *J Virol* 74(10):4853-4859
- von Mikecz A (2006) The nuclear ubiquitin-proteasome system. *J Cell Sci* 119(Pt 10):1977-1984
- Wang P, Palese P & O'Neill RE (1997) The NPI-1/NPI-3 (karyopherin alpha) binding site on the influenza A virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal. *J Virol* 71(3):1850-1856
- Weichert WS, Parker JS, Wahid AT, Chang SF, Meier E & Parrish CR (1998) Assaying for structural variation in the parvovirus capsid and its role in infection. *Virology* 250(1):106-117
- Weigel-Kelley KA, Yoder MC & Srivastava A (2003) Alpha5beta1 integrin as a cellular coreceptor for human parvovirus B19: requirement of functional activation of beta1 integrin for viral entry. *Blood* 102(12):3927-3933
- Weitzman MD (2006) The parvovirus life cycle: an introduction to molecular interactions important for infections. *Parvoviruses*, Kerr JR, Cotmore, S. F., Bloom M. E., Linden, R. M., Parrish, C. R. (Édit.) Hodder Arnold, London. p 143--156.
- Welchman RL, Gordon C & Mayer RJ (2005) Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(8):599-609
- Wilhelm S, Zimmermann P, Selbitz HJ & Truyen U (2006) Real-time PCR protocol for the detection of porcine parvovirus in field samples. *J Virol Methods* 134(1-2):257-260
- Willwand K, Mumtsidu E, Kuntz-Simon G & Rommelaere J (1998) Initiation of DNA replication at palindromic telomeres is mediated by a duplex-to-hairpin transition induced by the minute virus of mice nonstructural protein NS1. *J Biol Chem* 273(2):1165-1174
- Wu H & Rossmann MG (1993) The canine parvovirus empty capsid structure. *J Mol Biol* 233(2):231-244

- Yaegashi N, Niinuma T, Chisaka H, Uehara S, Moffatt S, Tada K, Iwabuchi M, Matsunaga Y, Nakayama M, Yutani C, Osamura Y, Hirayama E, Okamura K, Sugamura K & Yajima A (1999) Parvovirus B19 infection induces apoptosis of erythroid cells in vitro and in vivo. *The Journal of infection* 39(1):68-76
- Yeung DE, Brown GW, Tam P, Russnak RH, Wilson G, Clark-Lewis I & Astell CR (1991) Monoclonal antibodies to the major nonstructural nuclear protein of minute virus of mice. *Virology* 181(1):35-45
- Yu GY & Lai MM (2005) The ubiquitin-proteasome system facilitates the transfer of murine coronavirus from endosome to cytoplasm during virus entry. *J Virol* 79(1):644-648
- Zadori Z, Szelei J, Lacoste MC, Li Y, Garipey S, Raymond P, Allaire M, Nabi IR & Tijssen P (2001) A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity. *Dev Cell* 1(2):291-302
- Zadori Z, Szelei J & Tijssen P (2005) SAT: a late NS protein of porcine parvovirus. *J Virol* 79(20):13129-13138
- Zeeuw EJ, Leinecker N, Herwig V, Selbitz HJ & Truyen U (2007) Study of the virulence and cross-neutralization capability of recent porcine parvovirus field isolates and vaccine viruses in experimentally infected pregnant gilts. *J Gen Virol* 88(Pt 2):420-427
- Zheng C, Brownlie R, Babiuk LA & van Drunen Littel-van den Hurk S (2004) Characterization of nuclear localization and export signals of the major tegument protein VP8 of bovine herpesvirus-1. *Virology* 324(2):327-339
- Zimmerman JJ (2012) Porcine Parvovirus. *Diseases of swine*, Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex, 10th Ed. p 447-455.

ANNEXE I: RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

Importance des filaments intermédiaires

Des travaux effectués avec le protoparvovirus MVM ont montré en 2005 que l'infection menait à la réorganisation des réseaux d'actine et des filaments intermédiaires (Nuesch *et al.*, 2005). Aussi, la destruction des filaments intermédiaires par un traitement des cellules avec de l'acrylamide inhibe l'infection (Fay *et al.*, 2013). Nous avons donc testé la capacité du PPV d'infecter productivement les cellules suite au traitement avec l'acrylamide. Les résultats montrés dans la Figure 1 montrent que ce traitement inhibe aussi l'infection par le PPV suggérant un rôle pour les filaments intermédiaires pour l'infection par le PPV.

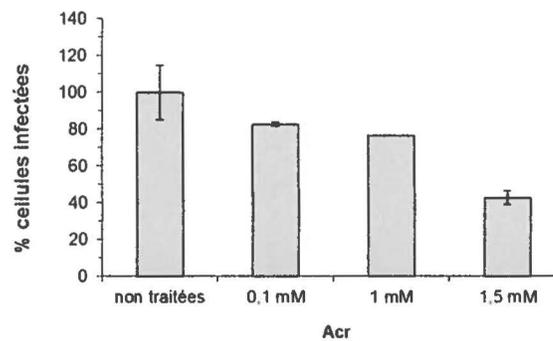


Figure 1. Inhibition de l'infection par le PPV suite à la destruction des filaments intermédiaires. Les cellules ont été traitées avec des doses croissantes d'acrylamide 1h avant l'infection. Les cellules ont été infectées avec une MOI de 2 pour 20 h en présence d'acrylamide avant d'être fixées. Les cellules avec réplication virale ont été identifiées par immunofluorescence (IF) avec un anticorps spécifique à la capsid. La survie cellulaire suite aux différents traitements a été évaluée qualitativement par le nombre et l'apparence des noyaux cellulaires, visualisés avec le colorant Hoechst. Les doses montrées ici n'étaient pas visiblement toxiques pour les cellules.

Destruction des microtubules en cours d'infection par le PPV

Il a été rapporté dans la littérature que les microtubules étaient activement protégés lors de l'infection par le protoparvovirus MVM. Nous avons donc traité les cellules PT avec l'agent dépolymérisateur de microtubules nocoazole à différents temps avant ou pendant l'infection par le PPV. Les cellules ont été fixées 2h post traitement et une IF avec un anti-tubuline a permis de visualiser le réseau de microtubules en microscopie confocale. Contrairement au virus MVM, nous n'avons observé aucune protection des microtubules suite à l'infection par le PPV.

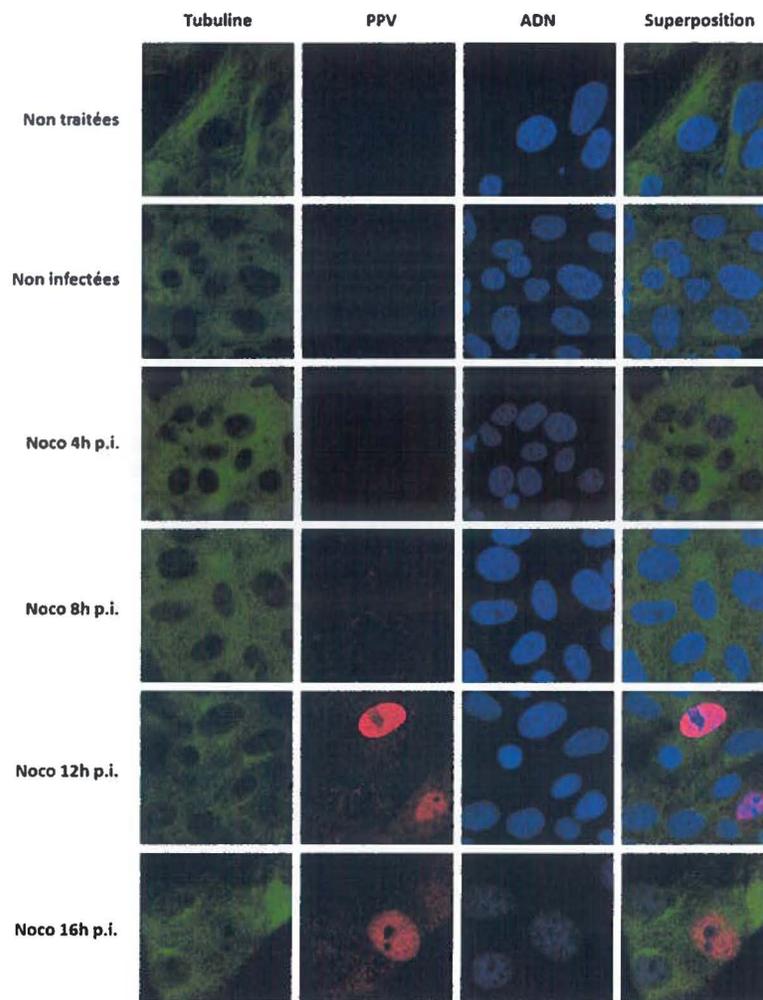


Figure 2. Destruction des microtubules en cours d'infection par le PPV

Les cellules ont été traitées à différents moments de l'infection avec l'agent dépolymérisateur des microtubules nocoazole. 2h post traitement, les cellules ont été fixées. L'IF a été effectuée telle que décrite dans la première publication. Les anticorps primaires étaient l'anti-tubuline (montré en vert) et l'anti-VP2 (montré en rouge). Les noyaux ont été colorés avec le colorant d'ADN Hoechst.

Analyse des régions basiques de VP1 et VP2

Nous avons identifié les acides aminés basiques afin de trouver des signaux de localisation nucléaire (NLS) potentiels, étant des régions avec plus de deux acides aminés basiques à proximité.

1	MAPP	<u>KR</u> ARG	LTLPGY	<u>K</u> YL	PGNSLDQGE	P	TNPSDAAA	<u>K</u> E	HDEAYD	<u>K</u> YI	<u>K</u>	} VP1up												
51	SGKN	PFYF	SADE	<u>K</u> FI	KET	EHA	<u>K</u> DYGG	KI	GHYFF	<u>R</u> A	<u>K</u> RA		FAP	<u>K</u> L	SETDS									
101	PTTS	QQPE	<u>V</u> R	<u>R</u> SPR	<u>K</u> HPG	<u>S</u> K	PPG	<u>K</u> RP	<u>A</u> PR	<u>H</u>	<u>I</u> FIN		<u>L</u> A	<u>K</u> K	<u>K</u> KA	<u>K</u> G	T	S	N	T	N	S	N	S
151	<u>M</u> SEN	VEQHNP	INAGTELSAT	GNESGGGGGG	GGG	<u>R</u> GAGG	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	} Région commune VP1/VP2
201	EFQYL	GEGLV	<u>R</u> ITAHAS	<u>R</u> LI	HLNMP	EHETY	<u>K</u> RIHVLNSES	GVAGQ	MVQ	DD														
251	AHTQM	VTPWS	LIDANAWGVW	FNPADWQLIS	NNMTEINLVS	FEQE	IFNVVL																	
301	<u>K</u> TITESATSP	PT	<u>K</u> IYNNDLT	ASLMVALDTN	NTLPYTPAAP	<u>R</u> SETLGFYPW																		
351	LPT	<u>K</u> PTQYRY	YLSCI	<u>R</u> NLNP	PTYTGQSQQI	TDSIQ	TGLHS	DIMFY	TIENA															
401	VPIHLL	<u>R</u> TGD	EFSTGIYHFD	<u>T</u> KPL	<u>K</u> LTHSW	QTN	<u>R</u> SLGLPP	<u>K</u> LLTEPTTEG																
451	DQHPG	TL	PAA	NTR	<u>K</u> GYHQTI	NNSYTEATAI	<u>R</u> PAQVGYNTP	YMNFEYS	NGG															
501	PFLT	PIVPTA	DTQYNDDEPN	GAI	<u>R</u> FTMDYQ	HGHLT	TSSQE	LE	<u>R</u> YTFNPQS															
551	<u>K</u> CGRAP	<u>K</u> QQF	NQQAPLNLEN	TNNGTLLPSD	PIGG	<u>K</u> SNMHF	MNTLN	TYGPL																
601	TALNNTAPVF	PNGQIWD	KEL	DTD	<u>K</u> PRLHV	TAPFVCK	NNP	PGQLFV	<u>K</u> IA	P														
651	NLTDDFNADS	PQQP	<u>R</u> IITYS	NFWW	<u>K</u> GTLTF	TAK	<u>M</u> SSNMW	NPIQQHTTTA																
701	ENIGNYIPTN	IGGI	<u>R</u> MFPEY	SQ	LIP	<u>R</u> KLY																		

Figure 3. Identification des résidus basiques des protéines structurales du PPV.

Séquence de la protéine VP1 qui contient la séquence entière de VP2 (le début de VP2 est surligné en bleu (MSEN)) en plus de sa partie unique (VP1up, résidus 1-150). Les acides aminés basiques sont surlignés en jaune. Les régions basiques contenant plus de 2 acides aminés basiques à proximité sont soulignées. Aucun NLS potentiel n'a été identifié dans la séquence de VP2. Les acides aminés 3-9 forment un NLS potentiel classique de type Pat7 et les acides aminés 124-141 forment un NLS potentiel classique bipartite.

Localisation des protéines virales dans le noyau

Les expériences d'IF lors de l'infection tardive ont montré que les protéines virales (NS1 et la capside) sont présentes dans la majorité du noyau, excepté certaines zones en point. Ces zones représentent le nucléole tel qu'observé par l'absence de colocalisation avec la nucléoline en IF.

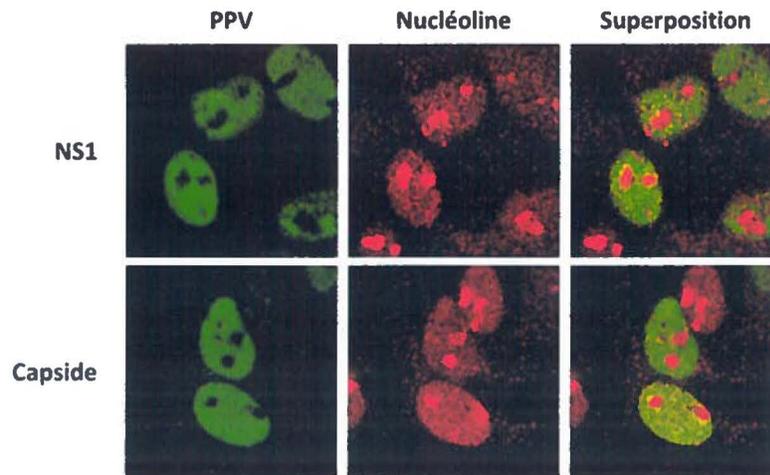


Figure 4. Localisation des protéines virales en comparaison avec le nucléole.

Les cellules ont été infectées pendant 20 heures. Ensuite les cellules ont été fixées et l'IF a été effectuée telle que décrite dans la première publication (Boisvert *et al.*, 2010). Les anticorps utilisés pour le virus étaient un anti-NS1 ou un anti-capside tous deux monoclonal et produit chez la souris. Pour le nucléole, nous avons utilisé un anti-nucléoline, produit chez le lapin. Les anticorps secondaires étaient l'anti-souris Alexa 488 et l'anti-lapin Alexa 588.

ANNEXE II: LISTE DES PUBLICATIONS

Articles scientifiques

1. **Maude Boisvert**, Véronique Bouchard-Lévesque, Sandra Fernandes, and Peter Tijssen. 2014. Classic nuclear localization signals and a novel nuclear localization motif are required for nuclear transport of porcine parvovirus capsid proteins. In press. *Journal of Virology*
2. Fernandes S*, **Boisvert M***, Szelei J and Tijssen P. 2014. Differential replication of two porcine parvovirus strains in bovine cell lines ensues from initial DNA processing and NS1 expression. *J Gen Virol.* Apr;95(Pt 4):910-21. *contribution équivalente
3. Pham HT, Yu Q, **Boisvert M**, Van HT, Bergoin M, Tijssen P. 2014. A Circo-Like Virus Isolated from *Penaeus monodon* Shrimps. *Genome Announc.* Jan 16;2(1).
4. Fernandes S, **Boisvert M**, Tijssen P. 2011. Genetic elements in the VP region of porcine parvovirus are critical to replication efficiency in cell culture. *J Virol.* Mar;85(6):3025-9.
5. **Boisvert M**, Fernandes S, Tijssen P. 2010. Multiple pathways involved in porcine parvovirus cellular entry and trafficking toward the nucleus. *J. Virol.* Aug;84(15):7782-92.

Chapitre de livre

1. **Boisvert M** and Tijssen P. 2012. Endocytosis of non-enveloped DNA viruses. *Molecular Regulation of Endocytosis.* Chapter 9. ISBN: 978-953-51-0662-3.

