

Université du Québec  
INRS-Institut Armand-Frappier  
Centre de recherche en biotechnologie et microbiologie

Activité enzymatique phospholipase A<sub>2</sub>  
de la protéine de structure VP1 du parvovirus porcin

Par:  
Marie-Claude Lacoste

Mémoire présenté pour l'obtention  
du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)  
en virologie et immunologie

15 janvier 2001

© droits réservés de Marie-Claude Lacoste, 2001

## TABLE DES MATIÈRES

Table des matières.....	iv
Liste des figures.....	vi
Liste des tableaux.....	viii
Liste des abbréviations.....	ix
Remerciements.....	x
INTRODUCTION.....	1
OBJECTIF.....	5
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	7
1. Généralités sur le parvovirus porcin.....	8
1.1 Taxonomie.....	8
1.2 Répartition géographique.....	8
1.3 Transmission.....	9
1.4 Le cycle infectieux.....	10
1.5 Souches virales.....	10
2. Aspects moléculaires des parvovirus.....	11
2.1 Aspects moléculaires du parvovirus porcin.....	11
2.2 La capside.....	12
2.3 La protéine NS1.....	12
2.4 Les protéines non structurales NS2 et NS3.....	14
2.5 Les protéines structurales.....	14
3. Généralités sur le parvovirus humain B19.....	22
3.1 Aspects moléculaires du B19.....	22
3.2 L'infection au B19.....	23
3.3 B19 et arthrite rhumatoïde.....	23
4. Anticorps antiphospholipides.....	23
4.1 Les antiphospholipides et le B19.....	24
5. La phospholipase A2.....	24
5.1 Réaction enzymatique.....	27
5.2 Les lipides.....	27
5.3 La liaison du substrat avec l'enzyme.....	28
5.4 Les différents groupes de PLA2.....	28
5.5 Le rôle de la PLA2 dans l'inflammation.....	32
5.6 Les acides aminés importants du site catalytique.....	33
5.7 L'inhibition de l'activité PLA2.....	34
6. Conclusion.....	35
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	36
1. Vecteurs et plasmides utilisés.....	37
1.1 Clonage avec le vecteur pPROEX HTb.....	37
1.2 Le plasmide VPi.....	37
1.3 Le sous-clonage dans le clone infectieux pN2.....	40
1.4 Le clone infectieux pN2.....	40
2. Mutagenèse dirigée.....	41
2.1 Introduction.....	41
2.2 Réaction de PCR.....	41
2.3 Digestion et transformation du produit de PCR.....	44
2.4 Minipréparation d'ADN rapide "UFX".....	44
2.5 Identification des mutants.....	45
2.6 Vérification par digestion sur gel d'agarose.....	45
2.7 Vérification par séquençage.....	46
3. système d'expression pBAD/TOPO® ThioFusion™.....	46
3.1 Généralités.....	46
3.2 Modifications du vecteur pBAD.....	49
3.3 Clonage dans pBAD.....	56
3.4 Expression dans pBAD.....	59
4. Clivage avec la protéase TEV.....	62
5. Inhibition de l'activité PLA2.....	62
5.1 Inhibition avec la manoalide.....	62
5.2 Inhibition avec l'oleyloxyéthyl phosphorylcholine.....	63
6. Essai avec <i>E. coli</i> .....	63

6.1	Caractéristiques générales de l'essai.....	63
6.2	Préparation des bactéries radioactives.....	64
6.3	Réaction enzymatique et analyse de l'activité PLA2.....	64
7.	Mesure de l'activité PLA2 avec les micelles mixtes.....	65
8.	Transfection de cellules PT avec les clones infectieux.....	66
8.1	Préparation des cellules.....	66
8.2	Transfection.....	66
9.	Immunofluorescence.....	66
10.	Amorces.....	67
10.1	Liste des amorces.....	67
10.2	Positions des différentes mutations et résultats.....	67
10.3	Descriptions des mutations effectuées et résultats obtenus..	67
11.	Solutions.....	74
11.1	Inhibiteurs.....	74
11.2	Milieux de culture.....	74
11.3	Solutions pour gel d'agarose.....	74
11.4	Solutions pour gel de polyacrylamide.....	75
11.5	Solutions pour minipréparation d'ADN.....	76
12.	Matériel.....	76
12.1	Anticorps.....	76
12.2	Appareils et accessoires.....	76
12.3	Cellules.....	77
12.4	Divers.....	77
12.5	Enzymes.....	77
12.6	Inhibiteurs.....	77
12.7	Marqueurs.....	78
12.8	Produits.....	78
12.9	Vecteurs.....	78
RÉSULTATS.....		79
1.	Réaction de PCR sur les clones mutés.....	80
2.	Expression de la partie unique de VP1.....	80
3.	Tests d'activité PLA2 des capsides de B19 et de PPV.....	80
3.1	Concentration en calcium.....	80
3.2	Inhibiteurs de la PLA2.....	89
4.	Chromatographie sur couche mince.....	89
4.1	Résultats de la digestion de phosphatidyl choline.....	89
4.2	Activité enzymatique des mutants.....	92
4.3	Activité PLA2 spécifique relative.....	92
5.	Transfections.....	97
5.1	Immunofluorescence.....	97
5.2	Infectivité des mutants.....	97
DISCUSSION.....		102
1.	Mutagenèse dirigée.....	103
2.	Expression de la partie unique de la VP1 du PPV.....	103
2.1	Expression dans le système pBAD/Thio.....	103
3.	Tests d'activité PLA2 des capsides de B19 et de PPV.....	104
3.1	Concentration en calcium.....	104
3.2	Les inhibiteurs de PLA2.....	104
4.	Activité PLA2 de la partie unique de la VP1 du PPV.....	105
4.1	Activité enzymatique dans la capside du B19 et du PPV.....	105
4.2	Activité enzymatique des mutants.....	105
4.3	Activité PLA2 spécifique relative.....	105
5.	Transfections des clones infectieux mutants et sauvages.....	107
5.1	Infectivité des clones infectieux.....	107
5.2	Infectivité relative des particules virales mutantes.....	108
CONCLUSION.....		110
LISTE DES RÉFÉRENCES.....		113

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b>	Séquences conservées chez les parvovirus.....	19
<b>Figure 2</b>	Séquences de la région du site catalytique de la PLA <sub>2</sub> de quatre parvovirus et quatre PLA <sub>2</sub> de sources différentes.....	21
<b>Figure 3</b>	Représentation schématique de l'activité enzymatique de la phospholipase A <sub>2</sub> et représentation du rôle des acides aminés importants du site catalytique de la PLA <sub>2</sub> ainsi que la position du micelle de phospholipides, de la molécule d'eau et de l'ion calcium.....	26
<b>Figure 4</b>	Carte du plasmide VPi: vecteur pBluescript avec la partie unique de la protéine VP1 du PPV.....	39
<b>Figure 5</b>	Schématisation du protocole de mutagenèse dirigée.....	43
<b>Figure 6</b>	Carte du vecteur pBAD/Thio avec un nouveau site de clonage multiple.....	51
<b>Figure 7</b>	Carte du vecteur pBAD/Thio avec le nouveau site de clonage multiple et un nouveau site de clivage pour la protéase TEV.....	55
<b>Figure 8</b>	Résultats du PCR effectué avec les amorces FPOVP15 et FPOVP133 sur les clones mutant et le clone sauvage dans le plasmide pT7-VP1.....	82
<b>Figure 9</b>	Expression de la partie unique de la protéine VP1, contenant l'activité PLA <sub>2</sub> , de type sauvage provenant de trois virus, PPV, GmDENV et B19 et provenant de PPV avec 5 mutations différentes.....	84
<b>Figure 10</b>	Expression de la partie unique de la protéine VP1 du PPV, contenant l'activité PLA <sub>2</sub> , avec les mutations P31W, H48A, HD48AN, D42E, D99N, P31L et P31R.....	86

<b>Figure 11</b>	Chromatographie sur couche mince: résultats de la digestion d'un phosphatidyl choline marqué radioactivement par les capsides de deux virus et par la PLA <sub>2</sub> provenant du venin d'abeille.....	91
<b>Figure 12</b>	Activité enzymatique de la PLA <sub>2</sub> virale sauvage et possédant les mutations P31L, P31W, D42N et D99N: chromatographie sur couche mince.....	94
<b>Figure 13</b>	Résultat de la transfection de cellules PT avec le clone infectieux sauvage et avec le clone infectieux possédant la mutation H48A.....	99

**LISTE DES TABLEAUX**

<b>Tableau I</b>	Les groupes de PLA <sub>2</sub> et leurs caractéristiques.....	30
<b>Tableau II</b>	Méthodes d'identification des mutants selon la mutation et le plasmide utilisés.....	48
<b>Tableau III</b>	Amorces pour le système pBAD/Thio-TOPO, pour le séquençage et pour les réactions de PCR.....	69
<b>Tableau IV</b>	Positions des différentes mutations et les résultats obtenus.....	71
<b>Tableaux V</b>	Amorces, description des mutations effectuées et résultats obtenus.....	73
<b>Tableau VI</b>	Différents tests d'activité enzymatique des PLA <sub>2</sub> de la capsid du B19 et du PPV.....	88
<b>Tableau VII</b>	Activité de la PLA <sub>2</sub> de la partie unique de la VP1 de PPV selon la mutation.....	96
<b>Tableau VIII</b>	Résultats des transfections et infectivité du virus.....	101

## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

AAV:	Adeno-Associated Virus
ADN:	Acide désoxyribonucléique
ADV:	Aleutian Mink Disease Parvovirus (parvovirus de vison)
Amp:	Ampicilline
ARN:	Acide ribonucléique
B19:	Parvovirus humain MVM:Minute Virus of Mice (virus minuscule de la souris)
CPV:	Canine Parvovirus (parvovirus canin)
°C:	degré Celsius
dNTP:	désoxynucléotides tri-phosphate
FBS:	Fetal Bovine Serum (sérum de veau fétal)
kDa:	kiloDalton
NS:	non structurale
PCR:	Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
PLA <sub>2</sub> :	Phospholipase A <sub>2</sub>
PPV:	Porcine Parvovirus (parvovirus porcin)
PT:	Porcine Testis
rpm:	rotation par minute
VP:	Viral Protein (protéine virale ou protéine de capside)

## REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier mon directeur de recherche, M. Peter Tijssen, pour son support, ses nouvelles idées et ses connaissances scientifiques.

Benoît Hébert, pour sa patience, ses encouragements et ses conseils lors de mes premiers stages en laboratoire de même que tout au long de ma maîtrise.

Zoltan Zadori avec qui j'ai collaboré lors de ce projet, je le remercie d'avoir partager avec moi ses découvertes importantes et intéressantes sur la phospholipase A<sub>2</sub> et de m'avoir permis de participer à ses recherches.

Merci à Lise Forget du service de séquençage de l'INRS-Institut-Armand-Frappier pour le service rapide et pour son aide.

Merci au fond FCAR pour le support financier.

Merci à mes collègues du laboratoire de Peter Tijssen ainsi qu'à tous les étudiants de l'édifice 12.

Finalement, merci à mes parents, Jacques et Marguerite, ainsi qu'à mes deux frères, Martin et Philippe, pour leur support, leurs encouragements et leur présence tout au long de mes études.



## **INTRODUCTION**

Le parvovirus porcin (PPV) est l'agent responsable du syndrome SMEDI décrit par Howard Dunne dans les années 60. Ce syndrome regroupe les problèmes de reproduction identifiés dans les élevages de porcs infectés: Stillbirth, Mummified, Embryonic Death, Infertility ou plutôt, syndrome des morts-nés, des foetus momifiés, de la mort embryonique et de l'infertilité (Dunne *et al.*, 1965).

Le PPV fait partie de la famille *Parvoviridea* et du genre *Parvovirus*, un virus à réplication autonome qui infecte les vertébrés. Il est retrouvé partout sur le globe et il est constamment présent dans la plupart des troupeaux (Mengeling, 1986 et Meredith, 1997). L'infection au PPV est dangereuse lorsque des truies gestantes séronégatives sont infectées durant la première moitié de la gestation. Seul le virus, et non les anticorps maternels, peut traverser la barrière placentaire et ainsi infecter les foetus non-immunocompétents (Mengeling, 1986). Pour les éleveurs, le PPV cause des pertes économiques importantes (Mengeling, 1986). Un indice de la présence d'une épidémie de PPV dans un élevage est l'apparition de foetus momifiés et de morts-nés dans les portées (Molitor et Joo, 1990). Le PPV est un petit virus, eucaryote et non enveloppé qui possède un génome sous forme d'un ADN simple brin, linéaire, de polarité négative composé de 5100 nucléotides. Le génome du PPV code pour cinq protéines, trois protéines de structure constituant la capsid et trois protéines non structurales importantes lors de la réplication. Le PPV est parmi les virus les moins susceptibles aux variations de la température et du pH (Tijssen et Bergeron, 1994).

Le PPV ne pouvant pas stimuler les cellules au repos à entrer en division cellulaire, il doit infecter des tissus où la division cellulaire est importante comme l'embryon ou le foetus. L'adsorption se fait grâce aux protéines de capsid et il y a ensuite internalisation. La réplication, l'assemblage et l'encapsidation se déroulent dans le noyau. Les mécanismes et les stratégies employés pour traverser la membrane et le cytoplasme de la cellule hôte sont peu connus chez les parvovirus. D'après des recherches récentes sur l'importance de la VP1 dans l'infection chez MVM, le rôle de la VP1 se situerait au niveau de l'entrée du virus, après la liaison au récepteur (Cotmore *et al.*, 1999). Les protéines VP1 de tous les membres des *Parvoviridae* possèdent une région fortement conservée d'environ 80 acides aminés située à l'extrémité N-terminale de la protéine. Cette région est située dans la partie unique de la VP1, celle qui code seulement pour la VP1 et non celle partagée avec VP2. Ces peptides spécifiques aux protéines VP1 sont essentiels pour jouer son rôle dans l'infection, mais il doit y avoir la présence d'un stimulus externe pour induire l'exposition des peptides à la surface de la capsid car ils ne sont pas accessibles sur les

particules virales nouvellement formées. Le stimulus naturel responsable de cette exposition reste encore inconnu. Pour ce qui est du PPV, il reste à déterminer si le même phénomène s'applique et si la liaison de la protéine VP2 à son récepteur cellulaire pourrait déclencher l'exposition de la protéine VP1. Récemment, il a été découvert dans notre laboratoire que la partie unique de la VP1 contient les acides aminés similaires au site catalytique de la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (Zadori *et al.* 2000); il est possible que l'activité PLA<sub>2</sub> soit importante lors de l'infection avec le PPV.

La séquence très conservée de la partie unique des protéines VP1 des parvovirus a été comparée aux séquences de plusieurs protéines grâce à une banque de données. La famille des phospholipases A<sub>2</sub> sécrétées a une certaine homologie de séquence avec celle des parvovirus pour des acides aminés retrouvés au site catalytique de la PLA<sub>2</sub>. Ces acides aminés sont très conservés chez les différents groupes de PLA<sub>2</sub>: il s'agit de l'histidine en position 48 (His-48), l'acide aspartique en position 49 (Asp-49) et l'acide aspartique en position 99 (Asp-99). Le site de liaison au calcium, formé d'un acide aminé comme par exemple la leucine entre deux glycines, est situé en amont de la diade HD et est très conservé, tout comme la diade, chez les PLA<sub>2</sub> parvovirales. Cependant, l'acide aspartique à la position 99 n'est pas présent chez les PLA<sub>2</sub> parvovirales, du moins pas dans les 50 acides aminés en aval de la diade. Il se retrouve plus loin dans la séquence (Zadori *et al.* 2000).

Un autre acide aminé de fonction inconnue est très conservé parmi les PLA<sub>2</sub> et les PLA<sub>2</sub> virales: l'acide aspartique dans la position 42 (Asp-42). Il pourrait donc y avoir une activité enzymatique PLA<sub>2</sub> dans la capsid des parvovirus étant donné la présence des acides aminés du site catalytique de la PLA<sub>2</sub> dans la séquence de la partie unique de la VP1.

Les PLA<sub>2</sub> sont très répandues dans la nature. Elles forment une famille de protéines de fonctions et de sources très diversifiées (Dennis, 1997). Par exemple, la PLA<sub>2</sub> pancréatique participe à la digestion des phospholipides dans l'intestin, tandis que la PLA<sub>2</sub> des venins participe directement à la toxicité du venin et la PLA<sub>2</sub> du liquide synovial a son importance au niveau inflammatoire (Kennedy *et al.*, 1995). On retrouve des PLA<sub>2</sub> provenant des venins de cobra, de vipères, de serpents à sonnettes, de lézards et d'abeilles. Chez les mammifères, les PLA<sub>2</sub> proviennent du liquide synovial, des plaquettes, du liquide pancréatique, des cellules du coeur, du placenta, des poumons et du foie (Dennis, 1997 et Tischfield, 1997).

C'est dans le liquide pancréatique et dans le venin de cobra que les premières activités PLA<sub>2</sub> furent étudiées au début de 20e siècle (Dennis, 1994, et Tischfield, 1997). L'importance de la PLA<sub>2</sub> se situe au niveau de la transduction de signaux, la synthèse des eicosanoïdes, le remodelage des membranes et le métabolisme général des lipides (Dennis, 1997). Cette enzyme est retrouvée en très grande quantité aux sites d'inflammation et peut aussi induire l'inflammation de façon expérimentale chez des animaux en laboratoire (Reynolds, Hughes et Dennis, 1992).

Parmi les parvovirus possédant les acides aminés du site catalytique des PLA<sub>2</sub>, on retrouve le B19, découvert en 1975, qui est un parvovirus qui infecte les humains (Brown et Young, 1997). Ce virus est le représentant du genre Erythrovirus regroupant les parvovirus à réplication autonome qui ont un tropisme pour les précurseurs d'érythroïdes (Naidés, 1998). Le symptôme majeur dans le cas d'individus sains est l'érythème infectieux aussi appelé cinquième maladie de l'enfant (Brown et Young, 1997). Chez les adultes, l'érythème infectieux est moins fréquent, le symptôme le plus commun étant celui des articulations enflées (Naidés, 1998). Il n'est pas rare chez les adultes infectés de retrouver des cas d'arthrite. Les articulations sont enflées et raides causant beaucoup de douleur (Brown et Young, 1997). La présence d'anticorps antiphospholipides et de symptômes semblables permet de croire qu'il y aurait un lien entre une infection au B19 et l'arthrite rhumatoïde (Naidés, 1998).

Puisqu'on retrouve un niveau élevé de PLA<sub>2</sub> sécrétée dans la circulation pour des maladies inflammatoires tel que l'arthrite rhumatoïde juvénile ou adulte et le choc septique, la possibilité qu'il existe une activité PLA<sub>2</sub> dans la capsid des parvovirus ouvre la voie à des recherches plus poussées dans le but de comprendre les liens unissant PLA<sub>2</sub>, B19, anticorps antiphospholipides et maladies inflammatoires autoimmunes.

## **OBJECTIF**

Les acides aminés essentiels du site catalytique de la PLA<sub>2</sub> sont très conservés parmi les PLA<sub>2</sub> provenant de différents groupes, mais se retrouvent aussi dans la séquence de la partie unique de la protéine VP1 des parvovirus. Il est donc possible que ces acides aminés forment aussi un site catalytique dans la capsidie des parvovirus. Il y aurait donc une activité enzymatique PLA<sub>2</sub> dans la capsidie des parvovirus. Pour vérifier la présence d'une activité PLA<sub>2</sub> dans la capsidie des parvovirus, plusieurs expériences seront effectuées.

Tout d'abord, à l'aide de protéines VP1 provenant des capsides de deux parvovirus, le B19 et le PPV, il sera possible de vérifier si, en présence de phospholipides, il y a présence de la réaction enzymatique attendue. Une fois la présence d'une activité enzymatique établie, les mutations qui seront effectuées sur les acides aminés importants du site catalytique de la PLA<sub>2</sub> dans la séquence du PPV, permettront de confirmer qu'il s'agit bien d'une activité PLA<sub>2</sub> dans la capsidie de PPV. L'utilisation d'inhibiteurs de la PLA<sub>2</sub> permettra d'appuyer les résultats obtenus.

L'importance d'une activité PLA<sub>2</sub> pour le virus se situerait au niveau des premières étapes de l'infection: la liaison au récepteur et la pénétration du virus dans la cellule. Les mutations effectuées sur les acides aminés du site catalytique de la PLA<sub>2</sub> de la capsidie permettront de vérifier si le virus conserve ou perd son infectivité lorsque les mutations diminuent ou suppriment l'activité enzymatique. Grâce à des transfections avec les clones infectieux sauvages ou possédant des mutations affectant les différents acides aminés du site catalytique de la PLA<sub>2</sub>, il sera possible d'évaluer l'importance de ces acides aminés pour l'infectivité des parvovirus.

Il est important dans ce projet de s'assurer que la capsidie du PPV possède une activité PLA<sub>2</sub>, que les mêmes acides aminés du site catalytique de la PLA<sub>2</sub> sont ceux conférant au virus l'activité PLA<sub>2</sub> et que cette activité joue un rôle dans les premières étapes de l'infection. Les résultats de ces expériences sont essentiels à la poursuite du projet. Ils permettront ensuite de comprendre les liens entre la présence d'une activité PLA<sub>2</sub> sur la capsidie des parvovirus, la présence d'anticorps antiphospholipides chez les individus infectés avec le B19 et chez les patients atteints de maladies auto-immunitaires comme l'arthrite rhumatoïde et le lupus et finalement l'infection au B19 comme précurseur de ces maladies.

## **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## 1. Généralités sur le parvovirus porcin

Bien que le syndrome majeur ait été décrit par Howard Dunne dans les années 60, ce n'est qu'en 1975 que le parvovirus porcin (PPV) a été isolé pour la première fois. Le syndrome causé par une infection au PPV se manifeste par la présence de morts-nés, de foetus momifiés, par la mort embryonique et par l'infertilité. Ce syndrome est connu sous le nom de syndrome SMEDI pour Stillbirth, Mummified, Embryonic Death et Infertility (Dunne *et al.*, 1965).

### 1.1 Taxonomie

Le parvovirus porcin fait partie de la famille *Parvoviridae*, virus à ADN, qui est divisée en deux sous-familles soit celle des *Densovirinae* où sont regroupés les virus des invertébrés et celle des *Parvovirinae* avec les virus infectant les vertébrés. Ce dernier sous-groupe, les *Parvovirinae* comporte 3 genres. Premièrement, il y a le genre Parvovirus avec des virus à réplication autonome comme par exemple le MVM (Minute Virus of Mice), l'ADV (Aleutian Disease Virus), le CPV (Canine Parvovirus) et le PPV. Le deuxième genre, Dependovirus, regroupe des virus dont la réplication dépend de la présence d'un virus-aide comme l'adénovirus. Les AAV (Adeno-associated virus), virus associé à un Adénovirus, font partie de ce genre. Finalement, le genre Erythrovirus qui regroupe des virus à réplication autonome tout comme le genre Parvovirus, mais ont une stratégie différente pour la réplication et l'expression des protéines. Le virus représentatif de ce genre est le parvovirus humain, nommé B19. La plupart des virus du genre Parvovirus n'encapside que le brin négatif d'ADN. L'encapsidation de 50% de brins positifs et de 50% de brins négatifs se fait chez les Densovirus, les Erythrovirus et les Dependovirus (Tijssen, 1990).

### 1.2 Répartition géographique

La répartition géographique des parvovirus est simple: ils sont retrouvés partout dans le monde où se retrouve l'hôte spécifique du parvovirus. Cependant, certaines souches sont plus répandues que d'autres. Par exemple, pour ce qui est du PPV, les souches responsables du syndrome SMEDI sont retrouvées partout sur le globe, mais les souches causant des lésions vésiculaires sont plutôt retrouvées au niveau local (Tijssen et Bergeron, 1994). Le PPV est présent de façon endémique dans la majorité des troupeaux testés (Mengeling, 1986 et Meredith, 1997).



### 1.3 Transmission

La transmission du PPV se fait principalement de façon horizontale, par la voie oro-nasale, mais peut aussi se faire par voie fécale-orale, par les sécrétions des voies respiratoires, par la poussière, les vêtements et la nourriture. L'hôte doit être susceptible et le virus doit être présent en assez grande quantité pour engendrer une infection. La grande résistance du parvovirus à son environnement est un facteur important pour la réussite d'une transmission horizontale. Le virus peut aussi se transmettre de façon verticale de la mère aux embryons ou aux foetus en autant qu'il y ait virémie (Tijssen et Bergeron, 1994). Une fois la transmission réussie, l'infection au PPV cause normalement peu ou pas de dommages. Les problèmes surviennent lorsqu'une truie gestante séronégative est infectée par la voie oro-nasale durant la première moitié de la gestation et que le virus traverse la barrière placentaire pour infecter les foetus non immunocompétents (Mengeling, 1986). Il doit y avoir virémie pour que le virus puisse traverser le placenta et infecter les embryons ou les foetus. Les anticorps de la femelle gestante ne traversant pas le placenta, le foetus a peu de chance de survivre avant d'être immunocompétent donc en mesure de produire des anticorps pour combattre l'infection. Pour les éleveurs, le PPV est donc un problème économique très important (Mengeling, 1986).

L'infection des foetus ou des embryons a lieu 10-14 jours après l'infection de la femelle gestante. Le virus peut alors se propager de foetus à foetus dans l'utérus (Meredith, 1997). Si l'infection a lieu durant les premiers 35 jours de gestation, il y a mort des embryons ou des foetus. Lorsque la mort a lieu pendant les 35 premiers jours de gestation, les embryons ou les foetus se dégènerent et disparaissent. On n'assiste que très rarement à des avortements (Meredith, 1997). Cependant, si l'infection a lieu entre les 35<sup>ième</sup> et 70<sup>ième</sup> jours de gestation, il y a mort et momification (Molitor et Joo, 1990). Généralement, si l'infection a lieu après 70 jours de gestation, les foetus survivent car ils sont alors devenus immunocompétents et peuvent produire une réponse immunitaire capable de les protéger contre l'infection au PPV. À la naissance, ils présentent une infection virale et un haut taux d'anticorps neutralisants (Meredith, 1997).

Un autre signe d'une infection au PPV pourrait être l'apparition de dermatites chez les adultes. Cependant, l'infection doit avoir lieu avec la souche la plus pathogène, la souche Kresse (Tijssen et Bergeron, 1994).

## 1.4 Le cycle infectieux

Les parvovirus ne partagent pas la propriété des autres virus à ADN de stimuler les cellules au repos à entrer en division cellulaire pour synthétiser de l'ADN, c'est pourquoi les parvovirus infectent des tissus en division mitotique active comme les embryons, les foetus, l'épithélium intestinal ou le système hématopoïétique. Le PPV, comme les autres parvovirus, a donc une prédilection pour les cellules en division rapide.

Les premières étapes de l'infection (l'adsorption, la pénétration et la décapsidation) ne semble pas requérir de fonctions virales spécifiques, seulement les processus normaux cellulaires (Tijssen et Bergeron, 1994). L'adsorption se fait grâce aux protéines de capsides et il y a ensuite internalisation. Il y a encore peu d'informations sur les premières étapes de l'infection au PPV, mais des recherches récentes par Cotmore et ses collaborateurs (Cotmore *et al.*, 1999), ainsi que par le laboratoire de Peter Tijssen apportent des indices importants qui permettront d'élucider les mécanismes de l'infection du PPV. Après avoir pénétré la cellule, le virus est transporté jusqu'au noyau de la cellule infectée. La décapsidation doit avoir lieu dans la zone périnucléaire ou dans le noyau. La réplication de l'ADN viral a lieu dans le noyau grâce, entre autres, à la protéine non structurale NS1. Les protéines de structure sont transportées vers le noyau, site de l'assemblage et de l'encapsidation. Le cycle se termine par le relâchement des particules virales par lyse cellulaire (Tijssen et Bergeron, 1994; Jacoby *et al.*, 1996).

## 1.5 Souches virales

L'infection au PPV est généralement sans danger pour les adultes à l'exception de certaines souches qui causent des dermatites ou des troubles entériques. C'est pour les truies gestantes qu'une infection au PPV est le plus problématique. D'autres souches qui sont non virémiques et ne causent aucun danger lors d'une infection de la femelle gestante, provoquent des avortements si l'inoculation avec ces souches à lieu *in utero* (Molitor et Joo, 1990). La souche NADL-2 est très peu virémique donc peut être utilisée comme vaccin vivant modifié. La préparation de ce vaccin vivant modifié consiste à effectuer plus de 50 passages de la souche NADL-2 en culture cellulaire. Le virus est incapable de traverser la barrière placentaire après l'infection par voie orale ou intranasale de femelles gestantes séronégatives, donc est sans danger pour les embryons ou les foetus (Molitor et Joo, 1990). Il y a peu de différences dans le patron de restriction des différentes souches de PPV comme KBSH, NADL-8, NADL-2 et Kresse. La

différence se retrouve surtout au niveau de la virulence et au niveau des tissus touchés (Tijssen *et al.*, 1995).

## 2. Aspects moléculaires des parvovirus

Les parvovirus sont le seul groupe à posséder un ADN simple brin, linéaire. Le virus est dépendant de la cellule infectée pour sa réplication puisque cette dernière a lieu dans le noyau. Les virus requièrent donc la présence de cellules en division ou d'un virus assistant. La taille des génomes des parvovirus varie entre 4000 et 6000 nucléotides. En moyenne, les virus possèdent un génome de 5000 nucléotides. La propriété des parvovirus d'agglutiner les globules rouges est très importante dans l'identification des différents sérotypes. En effet, l'inhibition de l'hémagglutination grâce à des sérums spécifiques est une façon de distinguer les parvovirus (Arella *et al.*, 1990).

### 2.1 Aspects moléculaires du parvovirus porcin

En latin, parvo signifie petit ou pauvre: le PPV est donc un petit virus non enveloppé. La capsidie icosaédrale du virus mesure 20-25 nm de diamètre et elle referme le génome qui est une molécule d'ADN simple brin, linéaire, de polarité négative et qui est composé de 5100 nucléotides. Aux extrémités 5' et 3' de l'ADN se trouvent des séquences palindromiques terminales. Deux promoteurs importants font partie du génome du PPV: le promoteur P4 qui agit au niveau de l'expression des protéines non structurales et le promoteur P40 pour l'expression des protéines structurales. Il y a six protéines codées par le génome du PPV: trois protéines de structure qui forment la capsidie et trois protéines non structurales qui ont des fonctions diverses au niveau de la réplication du virus. Ces protéines sont les protéines structurales VP1 (84 kDa), VP2 (64 kDa) et VP3 (60 kDa) qui provient d'un clivage protéolytique de VP2, et les protéines non structurales NS1 (76 et 84 kDa), NS2 (18 kDa) et NS3 (12,4 kDa) (Tijssen, 1990). Lors de l'encapsidation, on ne retrouve que le brin négatif puisque le PPV n'encapsidie pas, sauf exception, de brins positifs (Tijssen *et al.*, 1995; Tijssen et Bergeron, 1994).

L'extrémité gauche (3') du brin négatif est en tête d'épingle, forme une structure en Y et compte 115 nucléotides. L'extrémité droite (5') est aussi en tête d'épingle, mais forme cette fois-ci une structure nommée crucifix et compte 203 nucléotides (Tijssen et Bergeron, 1994). À l'extrémité 3' du génome, la séquence se replie sur elle-même pour former une structure

palindromique en forme de Y qui sert d'amorce pour initier la réplication. On obtient donc de l'ADN double-brin essentiel pour permettre ensuite la transcription et la réplication (Tijssen *et al.*, 1995).

## 2.2 La capside

De façon plus détaillée, la capside du PPV possède une structure icosaédrale avec une symétrie d'axe deux, trois et cinq, un diamètre d'environ 24 nm et contient 12 capsomères pour un total de 60 sous-unités. Cette structure va être différente si la capside contient de l'ADN ou si elle est vide (Arella *et al.*, 1990). La masse moléculaire du virus est de  $5,3 \times 10^6$  daltons (Mengeling, 1986).

La capside du PPV en fait l'un des virus les plus stables. Il peut résister à des pH variant entre 2 et 11. La sonication ne réduit pas l'infectivité du virus, mais il est sensible aux rayons ultra-violet (UV). Il résiste à plusieurs détergents, mais il est sensible au SDS (dodécyl sulfate de sodium) (Tijssen et Bergeron, 1994). La chaleur a peu d'effet sur la capacité d'infection du virus, mais il peut être inactivé par la formaline. Plusieurs produits peuvent être utilisés pour la purification du virus puisqu'il est résistant au butanol, au chloroforme, à l'éther, au tétrachlorure de carbone et à l'alcool. C'est un virus très dense car le ratio ADN:protéines est très élevé (Arella *et al.*, 1990). L'ADN viral a une masse moléculaire de  $1,4 \times 10^6$  daltons soit 26,5% de la masse totale (Mengeling, 1986).

## 2.3 La protéine NS1

Une des protéines codées par le génome du PPV est la protéine non structurale NS1 qui est la plus importante des trois protéines non structurales du virus. Peu d'information se retrouve dans la littérature au sujet de la protéine NS1 du PPV. Molitor et ses collaborateurs rapportent que la protéine NS1 est exprimée en premier dans les cellules, avant les protéines de structure du PPV (Molitor, Joo et Collett, 1985). C'est une protéine qui a une masse moléculaire de 76 kDa lorsqu'elle est sous sa forme non phosphorylée et de 84 kDa sous sa forme phosphorylée (Tijssen et Bergeron, 1994).

Bien que les propriétés de la NS1 du PPV soient peu connues, plusieurs recherches portant sur les protéines NS1 de MVM, ADV et B19 ont mené à une plus grande compréhension

de ses propriétés et de ses fonctions. Étant donné la grande homologie de séquences entre la NS1 du PPV et celle de MVM, les propriétés et fonctions attribuées à la NS1 chez ce dernier virus donnent un aperçu du rôle que joue la NS1 chez le PPV.

Chez MVM (virus minuscule de la souris), la protéine NS1 est essentielle à la réplication (Cotmore et Tattersall, 1996). Après traduction de l'ARN messenger dans le cytoplasme, les protéines NS1 sont localisées dans le noyau grâce à une séquence de localisation nucléaire (Peters, 1986). Chez MVM, trois lysines aux positions 214 à 216 sont responsables du transport des protéines NS1 vers le noyau, site de la réplication virale (Nüesch et Tattersall, 1993). La protéine NS1 possède une activité endonucléase: lors de la réplication, elle clive un brin de la forme répllicative double-brin de l'ADN grâce à une tyrosine dans le site actif de la protéine chez MVM (Nüesch, Cotmore et Tattersall, 1995; Willwand *et al.*, 1997). Une autre propriété de la protéine NS1 chez MVM est de s'attacher à des régions riches en séquences ACCA répétées 2-3 fois (Cotmore *et al.*, 1995). Chez les virus B19 (parvovirus humain) et MVM, la transactivation du promoteur qui contrôle la transcription des gènes des protéines non structurales est effectuée par la protéine NS1 (Doerig *et al.*, 1990). Finalement, la NS1 a une activité ATPase et hélicase chez MVM (Wilson *et al.*, 1991).

Les mêmes propriétés et fonctions de la NS1 de MVM sont retrouvées chez la NS1 de l'ADV (parvovirus du vison). La protéine NS1 de l'ADV est requise pour la réplication *in vitro* et *in vivo*, elle lie l'ADN selon une séquence spécifique et elle possède une activité endonucléase (clivage de l'ADN), hélicase et ATPase. La NS1 est responsable de la transactivation de la transcription et elle inhibe des promoteurs viraux et cellulaires (Christensen *et al.*, 1995).

Les propriétés et les fonctions de la protéine NS1 chez le PPV sont donc nombreuses et très importantes pour le virus. C'est une protéine nucléaire, phosphorylée, exprimée dans la phase précoce de l'infection, c'est-à-dire quelques heures après l'infection, probablement quatre à six heures, et sa demi-vie est de 6,5 heures. Elle est cytotoxique, possède une activité ATPase, peut se lier à l'extrémité 5' de l'ADN simple brin négatif viral et ses nombreuses fonctions sont l'activation du promoteur P4, la transactivation du promoteur P40 et la réplication du génome complet du PPV. Une fois la réplication complétée, la protéine NS1 reste attachée au génome viral à l'extérieur de la capsid et se détache juste avant ou pendant l'infection (Tijssen et Bergeron, 1994).

## 2.4 Les protéines non structurales NS2 et NS3

La deuxième protéine non structurale du PPV, NS2, est générée par épissage de l'intron qui contient l'ATPase, un élément de transactivation du promoteur P40. Cette protéine est cytoplasmique, phosphorylée dans la région N-terminale, a une demi-vie d'une heure et est impliquée au niveau de la virulence. Les travaux de Cotmore et de ses collaborateurs en 1997 indiquent que la protéine NS2 pourrait être importante lors de l'assemblage des protéines virales (Cotmore *et al.*, 1997). La troisième et dernière protéine non structurale, la NS3, n'a aucun rôle connu et sa région C-terminale se trouve dans la même région que le cadre de lecture pour la VP1. Le codon d'initiation pour la VP1 se retrouve donc juste après les codons de terminaison des protéines non structurales NS1, NS2 et NS3. Les masses moléculaires des protéines NS2 et NS3 sont déduites à partir de la séquence en acides aminés: 18 kDa pour la protéine NS2 et 12,4 kDa pour la protéine NS3.

## 2.5 Les protéines structurales

Le deuxième groupe de protéines essentielles pour le PPV est celui des protéines de la capsid. Tous les déterminants concernant le tropisme cellulaire, le choix de l'hôte et les propriétés d'hémagglutination s'y retrouvent (Tijssen *et al.*, 1995). Le PPV possède trois protéines de structure: la VP1, la VP2 et la VP3. Ces protéines ne sont pas glycosylées. Les séquences des protéines virales VP1 et VP2 sont superposées. Les protéines VP1 de tous les parvovirus possèdent une région en acides aminés fortement conservée. Cette région est située dans la partie unique de la VP1 donc dans la partie du génome ne codant que pour la VP1 et non la région utilisée par les deux protéines VP1 et VP2. Cette région est située dans la région N-terminale de la protéine VP1 et elle comporte environ 80 acides aminés.

Les gènes des protéines VP1 et VP2 étant superposés, c'est l'épissage alternatif qui détermine quelle protéine sera synthétisée (Bergeron, 1993). Dans la majorité des transcrits, le codon d'initiation pour la VP1, 2287-ATG dans un petit intron, est enlevé pour permettre la synthèse de la protéine VP2 grâce au codon d'initiation 2810-ATG ce qui donne une protéine de 64,3 kDa. Si le codon d'initiation de VP1 est conservé, on obtient une protéine de 80,9 kDa (Tijssen *et al.*, 1995). La protéine VP2 seule peut former des capsides entières et encapsider l'ADN, mais elle ne peut pas former de particules

infectieuses. La présence de la protéine VP1 est donc essentielle à l'infection (Arella *et al.*, 1990; Agbandje, Parrish et Rossmann, 1995).

Tout comme le PPV, MVM (Minute Virus of Mice, ou minivirus de la souris) possède trois protéines de structure, VP1, VP2 et VP3. La protéine VP2 a une masse moléculaire de 64 kDa, avec 587 acides aminés et elle prédomine la capsidie vide et les nouveaux virions. La VP1, 83 kDa, est présente en environ dix copies dans chaque particule et contient toute la séquence de VP2 en plus de contenir une séquence unique dans la région N-terminale de la protéine. Finalement, la VP3 est générée par clivage protéolytique de 25 acides aminés de la région N-terminale de la protéine VP2 chez les virions matures seulement. Le même site de clivage protéolytique se retrouve chez VP1, mais n'est pas utilisé, probablement dû à un changement dans la disposition du site (Cotmore *et al.*, 1999).

Chez MVM, les peptides spécifiques à la protéine VP1 (la région N-terminale de la protéine comptant 142 acides aminés) ne sont pas nécessaires à l'assemblage des particules virales, à l'encapsidation ou au relâchement des virus, mais ces peptides sont essentiels lors de l'infection avec les nouveaux virus. La VP1 agirait à une certaine étape encore inconnue, mais située après la liaison au récepteur et l'internalisation. La séquence de la partie unique de la VP1 est très bien conservée parmi tous les membres des Parvoviridae et il a été démontré que cette séquence est aussi responsable de la translocation des protéines VP1 nouvellement formées vers le noyau. La position précise de la région N-terminale de la protéine VP1 dans la capsidie est encore incertaine. Sa position durant les différentes étapes de l'infection pourrait donner des indices sur son rôle lors de la liaison au récepteur et lors de l'internalisation (Cotmore *et al.*, 1999).

### **2.5.1 Fonctions de la VP1 et de la VP2 lors de l'entrée du virus**

Les mécanismes et les stratégies employés par les parvovirus pour traverser la membrane et le cytoplasme de la cellule hôte afin de libérer leur matériel génétique dans le noyau de la cellule pour y être répliqué sont peu connus chez les parvovirus en général, incluant PPV. Chez MVM, les recherches récentes de Susan Cotmore (Cotmore *et al.*, 1999) ont permis de mieux comprendre le rôle de la VP1 lors de ce phénomène.

Selon les résultats obtenus par Cotmore et ses collaborateurs, les nouvelles particules virales, contenant ou ne contenant pas d'ADN, n'exposent pas la protéine VP1 à leur surface puisqu'elles ne précipitent pas avec un anticorps anti-VP1. Cependant, pour mieux comprendre les phénomènes entourant l'entrée du virus dans la cellule, il faut utiliser la propriété qu'ont les capsides de plusieurs groupes de virus de changer légèrement de conformation lorsqu'elles sont exposées à une source externe d'énergie comme la chaleur. Ce phénomène imite l'interaction de la capside avec le récepteur. Ce changement pourrait donc refléter les modifications de la structure virale qui se produisent lors de l'infection et lors de l'entrée dans la cellule (Cotmore *et al.*, 1999).

Chez MVM, l'exposition des particules vides à certaines températures ne permet pas aux capsides de précipiter avec un anticorps anti-VP1. Cependant, les particules complètes (contenant de l'ADN), après exposition aux mêmes températures, peuvent maintenant précipiter avec le même anticorps. La proportion de particules complètes précipitant avec l'anticorps augmente avec la température. Cependant, la température n'a pas modifié la réactivité du virus pour les anticorps monoclonaux, donc les modifications à la structure qui permettent l'exposition de VP1 n'affectent pas les épitopes structuraux. La réactivité avec des anticorps dirigés contre des déterminants de la structure virale est préservée pour des températures allant jusqu'à 70°C. Si les virus sont exposés à des températures plus élevées, il n'y a plus de réaction entre le virus et l'anticorps donc à ces températures, la structure est modifiée de façon très importante, c'est-à-dire qu'il y a dénaturation.

Cette infectivité du virus n'est pas dépendante de la protéine VP1 puisque le sérum dirigé contre la région N-terminale de VP1 a peu d'effet sur l'infectivité du virus en culture. Comme le sérum spécifique pour VP1 ne réagit pas avec les virus après leur libération, il est donc peu probable que ce sérum soit en mesure de neutraliser l'infectivité. Les expériences démontrent aussi que les virus exposant des domaines spécifiques à VP1 à leur surface sont minoritaires.

À mesure que les domaines spécifiques à la protéine VP1 sont exposés à la surface des particules, le titre infectieux diminue. Les expériences démontrent que lorsque les particules virales sont exposées à des températures dépassant les 70°C, le titre de particules infectieuses diminue de façon proportionnelle avec l'augmentation du nombre de particules qui exposent les domaines de leurs protéines VP1. Les particules ayant exposées cette portion de la protéine VP1 ne sont plus infectieuses.



La région N-terminale de la protéine de capsid VP2, de son côté, est exposée chez les particules contenant de l'ADN, mais reste séquestrée chez les particules vides. Contrairement à la région N-terminale de la VP1 qui n'est que rarement exposée à la surface des virus nouvellement libérés, la région N-terminale de la VP2 est présente à la surface des nouvelles particules sans aucun stimulus externe. Aucune des deux régions N-terminales n'est exposée à la surface des particules ne contenant pas d'ADN, donc la présence de l'ADN viral serait importante pour l'exposition de ces séquences à certains moments précis: dès le relâchement des virus dans le cas de la région N-terminale de la VP2 et après l'induction par la chaleur dans le cas de la région N-terminale de la VP1 (Cotmore *et al.*, 1999).

Les expériences précédentes indiquent que les domaines spécifiques aux protéines VP1 jouent un rôle dans l'entrée du virus qui se situe après la liaison de la capsid à la cellule puisque ces domaines ne sont pas accessibles sur les particules virales nouvellement formées. Cependant, pour pouvoir jouer son rôle, un stimulus externe doit induire l'exposition des domaines spécifiques de la VP1 à la surface de la capsid. Ce stimulus lors des expériences était la chaleur, cependant, la nature du stimulus naturel reste encore incertaine. Pour ce qui est du PPV, il reste à déterminer si les mêmes résultats s'appliquent et si la liaison de la protéine VP2 à son récepteur cellulaire pourrait déclencher l'exposition de la protéine VP1. Il est très probable que les résultats soient les mêmes pour le PPV, mais seulement les parvovirus MVM et PPV agiraient de la sorte puisque d'autres parvovirus, comme par exemple B19, exposent toujours leur VP1 à la surface.

La séquence en acides aminés de la partie unique de la VP1, région du génome des parvovirus qui code seulement pour cette protéine, est très conservée parmi les parvovirus. Certains acides aminés sont systématiquement retrouvés à la même position chez presque tous les parvovirus (figure 1). Lors de la comparaison de cette séquence avec les séquences des protéines faisant partie d'une banque de données (Zadori *et al.*, 2000), la séquence de l'enzyme phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) semblait démontrer une homologie avec la séquence en acides aminés de la partie unique de la VP1 (figure 2). Cette homologie est très intéressante puisqu'elle se situe surtout au niveau du site catalytique. En effet, les acides aminés fortement conservés chez la VP1 sont ceux formant le site de liaison et de l'activité catalytique de la PLA<sub>2</sub>. Il sera donc intéressant d'évaluer si la VP1 du PPV possède une activité PLA<sub>2</sub>.

**Figure 1** Séquences conservées chez les parvovirus.

	*	20	*	40	*	60	*	80
MVMI	:	YLGPGNSLDQGEPTNPSDAAA	KEHDEAYDQYIKSGKNPYLYFSAADQRFIDQTKDAKDWGGKVGHYFFRTKRAFAPKLAT	:	80			
LuIII	:	YLGPGNSLNQGEPTNPSDAAA	KEHDEAYDQYIKSGKNPYLYFSPADQRFIDQTKDAKDWGGKVGHYFFRTKRAFAPKLST	:	80			
H1	:	---GNSLDQGEPTNPSDAAA	KEHDEAYDQYIKSGKNPYLYFSPADQRFIDQTKDAKDWGGKVGHYFFRTKRAFAPKLST	:	76			
Killham	:	YLGPGNSLDQGEPTNPSDAAA	KEHDLAYDEYIKSGKNPYLYFSPADQRFIDQTKDAKDWGGKVGHYFFRTKRAFAPKLST	:	80			
Mink	:	YLGPGNSLDQGEPTNPSDAAA	KEHDEAYAAAYLRSKGNPYLYFSPADQRFIDQTKDATDWGGKIGHYFFRAKKAIAPVLTD	:	80			
mouse1	:	YLGPGNSLDQGEPTNPSDAAA	KEHDEAYAAAYLRSKGNPYLYFSPADQRFIDQTKDATDWGGKIGHYFFRAKKAIAPVLTD	:	80			
feline	:	YLGPGNSLDQGEPTNPSDAAA	KEHDEAYAAAYLRSKGNPYLYFSPADQRFIDQTKDAKDWGGKIGHYFFRAKKAIAPVLTD	:	80			
CanineN	:	YLGPGNSLDQGEPTNPSDAAA	KEHDEAYDYIKSGKNPYLYFSAADQRFIDQTKDAKDWGGKIGHYFFRAKRAFAPKLSE	:	80			
Porcine	:	YLGPGNSLDQGEPTNPSDAAA	KEHDEAYDQQLKAGDNPYIKFKHADQEFIDNLQDTSFGGNLKGAVFQAKKRILEPFLG	:	80			
Mduck	:	YVGGPGLDKGPPVVKADSVA	LEHDKAYDQQLKAGDNPYIKFNHADQDFIDSLQDDQSFSGGNLGRAVFAKKRIVLEPLGL	:	80			
goose	:	YLGPGNGLDKGEPVNEADAAA	LEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAQFQERLQEDTSFGGNLGRAVFAKKRILEPFLG	:	80			
AAV2	:	YLGPFNGLDKGEPVNEADAAA	LEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAQFQERLQEDTSFGGNLGRAVFAKKRILEPFLG	:	80			
AAV3B	:	YLGPFNGLDKGEPVNEADAAA	LEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAQFQERLQEDTSFGGNLGRAVFAKKRILEPFLG	:	80			
AAV6	:	YLGPFNGLDKGEPVNEADAAA	LEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAQFQERLQEDTSFGGNLGRAVFAKKRILEPFLG	:	80			
AAV4	:	YLGPGNPLENGPPVDAVARI	HDFRYADLEKQGINPYTYTIADEELLKNLEHKTGGRAAIAARAFNFKKLTFPHAHL	:	80			
chipmunk	:	YLGPGNLEQAGPPQSAVDSA	ARIHDFRYSQAKLGINPYTHWTVADEELLKNIKNETGFQAQVVKDYFTLKGAAPVAHF	:	80			
B19	:	YVGPENLQAGPPQSAVDSA	AAARKHDFGYSDDLKEGKNPYLYFNTHDQNLIDELKDDTSFGGKLARGVFOIKKALAPALPG	:	80			
Bovine	:	YLGPFNSLFAGAPVKNKADA	AAARKHDFRYSQAKLGINPYTHWTVADEELLKNIKNETGFQAQVVKDYFTLKGLFTSTAHF	:	80			
simian	:	YIGPGNLQAGNPOSVVDAAA	RIHDFRYSQAKLGINPYTHWTVADEELLKNIKNETGFQAQVVKDYFTLKGLFTSTAHF	:	80			
		y gpgN L G P DaaA eHD aY	G NPY ad f	99 9 F K				



**Figure 2** Séquences de la région du site catalytique de la PLA<sub>2</sub> de quatre parvovirus et quatre PLA<sub>2</sub> de sources différentes.

GmDNV (insecte)  
PPV (porcin)  
B19 (humain)  
AAV-3 (humain)

YKYLGP<sup>G</sup>NSLNRGQPI<sup>NQ</sup>IDEDA<sup>KE</sup>HE<sup>DE</sup>AYDKV<sup>K</sup>TSQ<sup>E</sup>VS  
YKYLGP<sup>G</sup>NSLDQGEPT<sup>NP</sup>SDAAAKE<sup>HE</sup>DE<sup>AY</sup>DKYIK<sup>S</sup>GK<sup>NP</sup>  
TNYVGP<sup>G</sup>NELQAGPP<sup>Q</sup>SAVD<sup>SAA</sup>KE<sup>HE</sup>FRYDK<sup>V</sup>KTSQ<sup>E</sup>VS  
YKYLGP<sup>G</sup>NGLDKGP<sup>P</sup>VNKAD<sup>AA</sup>ALE<sup>HD</sup>KAYD<sup>Q</sup>QLKAG<sup>NN</sup>P

LATSE (venin)  
PSEUDEXIN (venin)  
TEXTILOTOX (venin)

CGYCGAGG---SGTPV<sup>DE</sup>LD<sup>RC</sup>CKI<sup>HD</sup>NCYGE<sup>AE</sup>KMG<sup>C</sup>YP  
CGYCGPGG---HGTPV<sup>DE</sup>LD<sup>RC</sup>CKI<sup>HD</sup>D<sup>CY</sup>GE<sup>AG</sup>KMG<sup>C</sup>YP  
CGYCGPGN---NGTPV<sup>DD</sup>V<sup>DR</sup>CCQ<sup>AH</sup>DE<sup>CY</sup>DEAS<sup>NH</sup>GC<sup>YP</sup>

PLA<sub>2</sub> bovine

YCGKGG---SGTPV<sup>DD</sup>LD<sup>RC</sup>CKT<sup>HD</sup>D<sup>CY</sup>GQAE<sup>KK</sup>GC<sup>FP</sup>

Consensus

Y GpGn G P D k HD Y g p

Liaison au Ca<sup>2+</sup>

Y G G D

Dans la littérature, plusieurs maladies auto-immunes ont été associées à la présence d'anticorps anti-phospholipides, comme par exemple le lupus et l'arthrite rhumatoïde. De plus, l'arthrite rhumatoïde a été associée à la présence d'une infection à un parvovirus, le parvovirus humain B19. Avant d'aller plus loin, il est important d'introduire le B19.

### **3. Généralités sur le parvovirus humain B19**

Le B19, découvert en 1975, est un parvovirus qui infecte les humains (Brown et Young, 1997). Ce virus est le représentant du genre Erythrovirus regroupant les parvovirus à réplication autonome qui ont un tropisme pour les précurseurs d'érythroïdes. Le virus B19 est spécifique à une espèce et il ne se réplique qu'à l'intérieur de cellules humaines (Naidés, 1998). Comme tous les parvovirus, le B19 a besoin de cellules en division pour sa réplication (Brown et Young, 1997). La toxicité pour les cellules vient de l'expression de la protéine non structurale laquelle mène les cellules à l'apoptose (Moffatt *et al.*, 1998). Le B19 n'infecte que les cellules érythroïdes ou les progéniteurs de cellules érythroïdes dans la moelle osseuse car ce sont les seules cellules à posséder le récepteur du virus nommé globoside, un glycosphingolipide neutre retrouvé sur ces cellules. Il est connu sous le nom d'antigène du groupe sanguin P, donc les individus ne possédant pas cet antigène ne peuvent pas être infectés avec le B19. Lors de la virémie, le virus se retrouve dans les sécrétions nasopharyngiques ce qui permet de conclure que le virus se transmet par voie aérienne (Brown et Young, 1997).

#### **3.1 Aspects moléculaires du B19**

Les particules virales sont de forme icosaédrale avec 20 faces triangulaires, 30 côtés et 12 sommets et renferment un génome de 5600 nucléotides, simple-brin, avec des palindromes terminaux qui forment des extrémités en forme de têtes d'épingles. L'extrémité 3' devient l'amorce qui permet le début de la réplication. Contrairement au PPV qui n'encapside que des brins à polarité négative (Tijssen et Bergeron, 1994), le virus B19 retient des brins positifs et négatifs lors de l'encapsidation en nombre égaux, mais seulement un brin d'ADN par capsid est retenu (Naidés, 1998). Le génome du B19 code pour une protéine majeure non structurale, deux protéines de capsid (VP1 et VP2) et quelques petites protéines de fonctions encore inconnues. Des capsides vides recombinantes ont pu être produites dans des systèmes d'expressions eucaryotes utilisant des cellules de mammifère ou d'insecte (Brown et Young, 1997).

### **3.2 L'infection au B19**

La plupart des infections au B19 sont asymptomatiques et chez les enfants, le symptôme majeur dans les cas d'individus sains est l'érythème infectieux aussi appelé cinquième maladie de l'enfant (Brown et Young, 1997). Ce symptôme se traduit par une rougeur sur les joues. En anglais, ce symptôme est mieux connu sous le nom de "slapped cheeks". Cependant, chez les adultes, les rougeurs sur les joues sont moins fréquentes et moins apparentes, mais les symptômes apparaissent plutôt sous la forme des symptômes de la grippe comme par exemple, les articulations enflées (Naides, 1998). Chez les adultes infectés avec le B19, surtout les femmes, il n'est pas rare de retrouver des cas d'arthrite. Les articulations sont enflées et raides causant beaucoup de douleur. La distribution est symétrique, touchant les mains et les pieds. Bien que les symptômes ne durent dans bien des cas qu'une à trois semaines, chez certaines femmes ils persistent plusieurs mois et même plusieurs années. De plus, une infection au B19 lors de la grossesse peut mener à un avortement (Brown et Young, 1997).

### **3.3 B19 et arthrite rhumatoïde**

Lors d'une infection aiguë au B19, la présence d'anticorps antiphospholipides ayant la même spécificité que ceux associés au lupus systémique érythémateux peut fausser le diagnostique. Une relation entre les deux événements n'a pas encore été établie (Naides, 1998). Cependant, contrairement à l'arthrite rhumatoïde, l'infection au B19 ne détruit pas les articulations (Brown et Young, 1997).

Le parvovirus B19 est donc associé à une maladie auto-immune. Étant donné la présence d'anticorps antiphospholipides chez les patients atteints de ces maladies auto-immunes, il est important de faire un bref survol de ces derniers.

## **4. Anticorps antiphospholipides**

Les anticorps antiphospholipides sont des immunoglobulines (IgG, IgM ou IgA) qui réagissent avec les phospholipides ou les complexes phospholipides-protéines chargés négativement (Triplett, 1992). Bien que les phospholipides soient de faibles antigènes, leur association avec des protéines pour former un complexe augmente l'antigénicité. Plusieurs protéines sont possiblement en cause: la prothrombine humaine, la protéine anticoagulante du



placenta, la thrombomoduline, certains facteurs tissulaires, la glycoprotéine-I  $\beta_2$  (GPI- $\beta_2$ ) et la phospholipase  $A_2$ .

Le syndrome antiphospholipide est défini par la présence d'anticorps antiphospholipides comme seule classe d'anticorps présents chez des patients souffrant de thromboses artérielles ou veineuses, de migraines, de troubles de vision, d'avortements spontanés précoces et de problèmes au niveau des valves cardiaques. Un autre syndrome antiphospholipide est retrouvé chez les patients atteints de lupus systémique érythémateux (Stratta *et al.*, 1997).

#### 4.1 Les antiphospholipides et le B19

Une exposition chronique au parvovirus humain, le B19, entraîne la production d'anticorps antiviraux possédant des propriétés de liaison et d'attachement aux autoantigènes. Le sérum des patients étudiés par Lunardi et ses collaborateurs en 1998, contenait des anticorps antiviraux capables de reconnaître des autoantigènes. Cette même propriété n'est pas présente pour les anticorps des individus sains, car dans leur cas, les anticorps avaient peu d'affinité pour les peptides du parvovirus et aucune affinité pour les autoantigènes. Les infections au B19 étant très fréquentes, on retrouve des anticorps anti-B19 chez 60% de la population (Lunardi *et al.*, 1998).

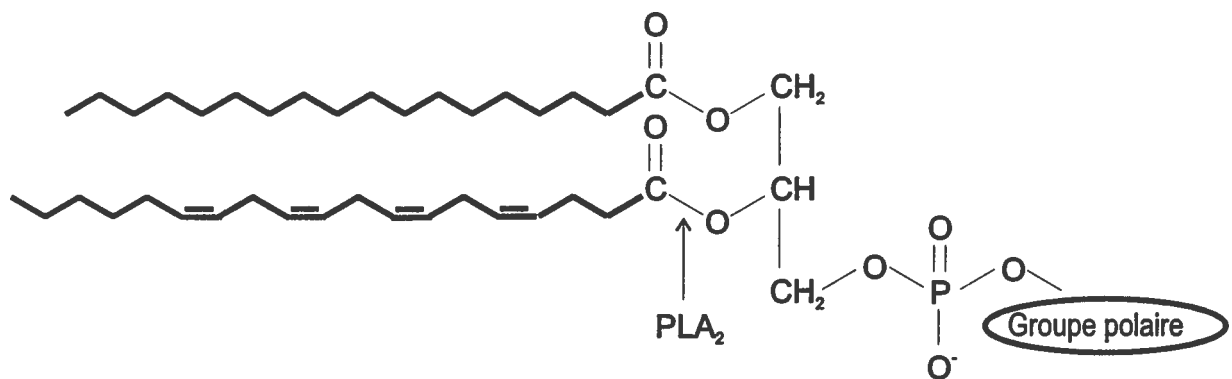
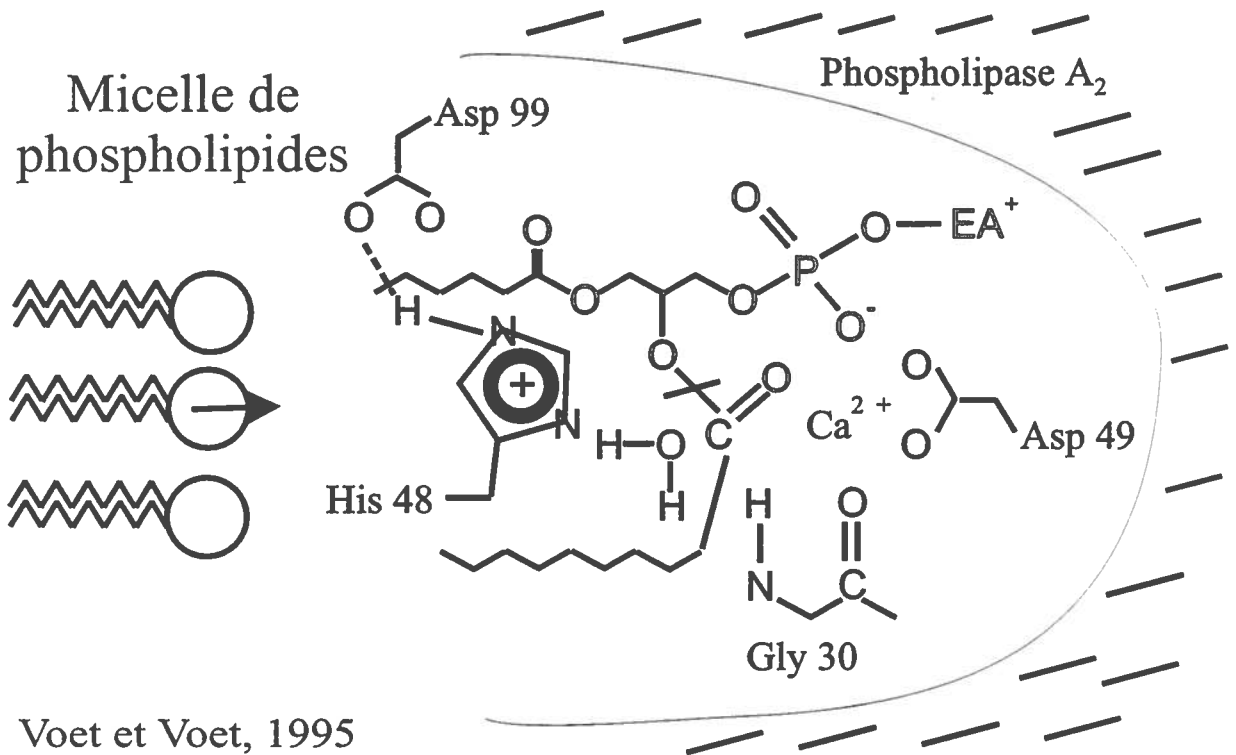
### 5. La phospholipase $A_2$

C'est dans le liquide pancréatique et dans le venin de cobra que les premières activités  $PLA_2$  furent étudiées au début de 20e siècle (Dennis, 1994; Tischfield, 1997). L'enzyme  $PLA_2$  est très répandue dans la nature et est retrouvée sous forme intracellulaire et extracellulaire (Yu *et al.*, 1990). L'importance de la  $PLA_2$  se situe au niveau de la transduction de signaux, la synthèse des eicosanoïdes, le remodelage des membranes et le métabolisme général des lipides (Dennis, 1997).

De façon plus précise, la  $PLA_2$  catalyse l'hydrolyse d'une chaîne d'acides gras au niveau du deuxième carbone d'un phospholipide (lien ester, donc la  $PLA_2$  est une estérase) libérant un acide gras libre et une molécule de lysophospholipide (figure 3). L'acide gras libéré à partir des phospholipides de membrane est dans certains cas un acide arachidonique ce qui constitue une étape importante dans le contrôle de la production d'eicosanoïdes dans la cellule (Reynolds,

**Figure 3** Représentation schématique de l'activité enzymatique de la phospholipase  $A_2$  et représentation du rôle des acides aminés importants du site catalytique de la  $PLA_2$  ainsi que la position du micelle de phospholipides, de la molécule d'eau et de l'ion calcium.

# Activité phospholipase A<sub>2</sub>



Hughes et Dennis, 1992). Les eicosanoïdes sont impliqués dans la pathophysiologie de plusieurs maladies, spécialement les maladies inflammatoires et les allergies (Yu *et al.*, 1990).

La PLA<sub>2</sub> a été purifiée à partir du liquide synovial de patients atteints d'arthrite et à partir de plusieurs types de cellules de mammifères. Cette enzyme est retrouvée en très grande quantité aux sites d'inflammation et peut aussi induire l'inflammation de façon expérimentale chez des animaux en laboratoire. Il serait très intéressant d'identifier des inhibiteurs de la PLA<sub>2</sub> pour les utiliser comme agents anti-inflammatoires potentiels (Reynolds, Hughes et Dennis, 1992). Les PLA<sub>2</sub> sont des enzymes stables à la chaleur (Heinrikson, Krueger et Keim, 1977) et solubles dans l'eau (Roberts *et al.*, 1977).

### 5.1 Réaction enzymatique

La digestion des lipides se passe à l'interface de l'eau et des lipides car ces derniers sont hydrophobes, tandis que l'enzyme est soluble dans l'eau. Cette interaction avec une interface composée d'eau et de lipides différencie la PLA<sub>2</sub> des autres estérases (Roberts *et al.*, 1977). Un seul phospholipide peut avoir accès à la fois au site catalytique de la PLA<sub>2</sub> (Lambeau *et al.*, 1995). Ce site contient une histidine [la seule dans la séquence en acides aminés (Roberts *et al.*, 1977)] et un acide aspartique qui forment la diade catalytique, une molécule d'eau et un ion calcium (Ca<sup>2+</sup>) lié à un autre acide aspartique. La molécule d'eau est activée par la diade catalytique ce qui lui permet d'attaquer le lien ester au niveau de la deuxième chaîne d'acide gras. Le rôle du calcium est de stabiliser la réaction. L'hydrolyse se fera seulement si l'enzyme est en présence d'un lien ester au niveau du deuxième carbone du phospholipide. L'ion calcium Ca<sup>2+</sup> est obligatoire au niveau du site catalytique de l'enzyme et dans plusieurs cas, le Ca<sup>2+</sup> se lie à l'enzyme avant l'arrivée du substrat (Renetseder *et al.*, 1985).

### 5.2 Les lipides

Les PLA<sub>2</sub> jouent un rôle important car elles agissent au niveau du métabolisme des lipides. Ces derniers sont indispensables à la structure de la cellule et à son métabolisme, que se soit pour emmagasiner de l'énergie sous forme de triacylglycérol ou pour la composition de la membrane avec les glycolipides et les phospholipides. Un autre lipide important est l'acide arachidonique qui est un acide gras non saturé et un précurseur des prostaglandines, des

prostacyclines, des thromboxanes et des leukotriènes, tous des médiateurs cellulaires importants de la réponse immunitaire (Voet et Voet, 1995).

La chaîne d'acide gras du premier carbone d'un phospholipide est généralement saturée alors que la chaîne du deuxième carbone est non saturée (Reynolds *et al.*, 1991). Si la PLA<sub>2</sub> agit au niveau de phospholipides condensés en micelle, son activité augmente de façon remarquable, d'un facteur allant jusqu'à 10<sup>5</sup> (Renetseder *et al.*, 1985). Les phospholipides avec de très longues chaînes d'acides gras ne formeront pas facilement des micelles. L'ajout de Triton X-100, un détergent non chargé, favorise la formation de micelles mixtes ce qui permet une plus grande solubilité du substrat (Reynolds *et al.*, 1991).

### **5.3 La liaison du substrat avec l'enzyme**

La liaison de la PLA<sub>2</sub> aux membranes et l'hydrolyse des phospholipides de ces membranes se font grâce à un canal hydrophobe dans lequel une seule molécule phospholipide peut pénétrer pour être clivée (figure 3). Une partie de ce canal est formée de résidus hydrophobes présents dans la région N-terminale (Tseng, Inglis et Scott, 1996).

La production de l'enzyme PLA<sub>2</sub> sous sa forme active dépend des changements de la conformation de la région N-terminale en hélice, en premier lieu lors de la liaison avec une micelle de phospholipides et en deuxième lieu, lors de la liaison du substrat avec le site actif. Les modifications de la structure tridimensionnelle de l'enzyme ouvrent la voie à la synthèse d'inhibiteurs pouvant modifier la structure de l'enzyme et ainsi inhiber l'activité PLA<sub>2</sub> (Tseng, Inglis et Scott, 1996).

### **5.4 Les différents groupes de PLA<sub>2</sub>**

Les PLA<sub>2</sub> forment une famille de protéines très diversifiée que l'on divise en cinq groupes (tableau I) (Dennis, 1997). Les différents groupes sont divisés en se basant sur la masse moléculaire, la séquence en acides aminés et l'homologie de séquence (la position des résidus cystéines pour les enzymes à faibles masses moléculaires), la dépendance au calcium et la localisation cellulaire (Tishfield, 1997).

**Tableau I** Les groupes de PLA<sub>2</sub> et leurs caractéristiques.

Groupe	Source	Type (1)	Masse moléculaire	Calcium requis	Ponts disulfures	Caractéristiques moléculaires
IA	Cobra	S	13-15 kDa	mM	7	diade His-Asp
IB	Pancréas humain et porcin	S	13-15 kDa	mM	7	diade His-Asp, boucle
IIA	Vipère, serpent, liquide synovial humain, plaquettes	S	13-15 kDa	mM	7	diade His-Asp, extension dans la région C-terminale
IIB	Vipère du Gabon	S	13-15 kDa	mM	6	diade His-Asp, extension dans la région C-terminale
IIC	Testicules de rats et de souris	S	15 kDa	mM	8	diade His-Asp, extension dans la région C-terminale
III	Abeille	S	16-18 kDa	mM	5	diade His-Asp
IV	Reins de rats, cellules humaines, plaquettes	C	85 kDa	< $\mu$ M		
V	Coeurs et poumons de rats, souris et humains et cellules P388D <sub>1</sub>	S	14 kDa	mM	6	diade His-Asp, sans extension dans la région C-terminale, sans boucle

(1) S = sécrétée et C = cytosolique

(Dennis, 1997)

Les trois groupes I, II et III regroupent les PLA<sub>2</sub> les plus petites, les plus élémentaires au niveau évolutif, les plus simples et dont le mécanisme du métabolisme des lipides est le mieux compris (Dennis, 1994). Ces PLA<sub>2</sub> sont sécrétées, de faibles masses moléculaires et dépendantes du Ca<sup>2+</sup> à une concentration de 1 mM (Dennis, 1997). La séquence en acides aminés ainsi que la présence et la position des ponts disulfures sont conservées parmi les groupes I et II. Les trois groupes utilisent l'histidine, assistée de l'acide aspartique (Dennis, 1997; Dennis, 1994). C'est le Ca<sup>2+</sup> qui stabilise la réaction. Des PLA<sub>2</sub> de sources et de fonctions diversifiées sont retrouvées dans ces trois groupes: la PLA<sub>2</sub> pancréatique participe à la digestion des phospholipides dans l'intestin, tandis que la PLA<sub>2</sub> des venins participe directement à la toxicité du venin. (Kennedy *et al.*, 1995). Les PLA<sub>2</sub> du groupe II sont présentes en abondance dans le liquide synovial et le plasma des patients atteints de maladies inflammatoires (Lambeau *et al.*, 1995).

Les PLA<sub>2</sub> de 14 kDa, donc les PLA<sub>2</sub> des groupes I, II, III et V (seul le groupe IV possède des PLA<sub>2</sub> de 85 kDa) ont des caractéristiques communes. Toutes les PLA<sub>2</sub> de 14 kDa utilisent un résidu histidine dans le site catalytique assisté d'un acide aspartique pour polariser une molécule d'eau et ensuite attaquer le lien ester du phospholipide. Le calcium est toujours présent chez ces PLA<sub>2</sub> sécrétées et elles requièrent des concentrations en calcium allant de 1 à 10 mM pour une activité maximale (Tischfield, 1997). Les groupes I et II sont parfois distingués par le type de PLA<sub>2</sub>: le groupe I est de type pancréatique et le groupe II, de type inflammatoire (Lambeau *et al.*, 1995). La PLA<sub>2</sub> du groupe III est retrouvée chez les abeilles et quelques lézards (Tischfield, 1997).

Le groupe V regroupe des PLA<sub>2</sub> retrouvées chez les humains, les rats et les souris. La masse moléculaire de ces PLA<sub>2</sub> est de 13,6 kDa. Le gène de la PLA<sub>2</sub> du groupe V est fortement exprimé dans le coeur et le placenta et de façon moins importante dans les poumons et le foie. C'est la PLA<sub>2</sub> de ce groupe qui est exprimée dans les cellules de type macrophages P388D<sub>1</sub> et les mastocytes (Tischfield, 1997).

Le groupe IV regroupe les PLA<sub>2</sub> intracellulaires, cytosoliques, ayant une masse moléculaire de 85 kDa et dépendantes d'une faible concentration de Ca<sup>2+</sup>, c'est-à-dire 1 μM. Cette dernière propriété servira à les distinguer des groupes I, II, III et V (Dennis, 1997; Tischfield, 1997). La PLA<sub>2</sub> cytosolique diffère aussi des PLA<sub>2</sub> sécrétées par sa préférence pour les phospholipides 2-arachidonyle (Hope, Chen et Morgan, 1993).



## 5.5 Le rôle de la PLA<sub>2</sub> dans l'inflammation

La PLA<sub>2</sub> est reconnue comme jouant un rôle important au niveau intracellulaire lors des réactions menant à l'inflammation, phénomène résumé par Pruzanski et Vadas en 1991. L'inflammation est une réaction qui sert à protéger le corps lors d'une blessure aux cellules et aux tissus. Elle sert à empêcher l'agent destructeur de pénétrer plus loin et éventuellement à l'éliminer. L'inflammation comprend une série de molécules, de médiateurs humoraux et de cascades qui agissent aux niveaux local et systémique (Pruzanski et Vadas, 1991). Ce processus peut être divisé en quatre étapes, c'est-à-dire, l'exposition à l'agent destructeur (externe ou interne), la synthèse et la libération des médiateurs proximaux, la synthèse et la sécrétion de PLA<sub>2</sub> et la synthèse et la libération des molécules effectrices distales. La première étape consiste à l'exposition à un agent externe (bactéries, parasites, toxines, virus, etc.) ou à un agent interne (autoantigènes, complexes immuns).

C'est lors de la deuxième étape que sont libérés les médiateurs de l'inflammation comme les interleukines, le TNF $\alpha$  (facteur nécrosant des tumeurs ou "tumor necrosis factor"), l'interféron et le facteur d'activation des plaquettes. Deux de ces molécules, l'interleukine-1 (IL-1) et le TNF, sont importantes pour la synthèse et la libération de la PLA<sub>2</sub> qui fait partie de la troisième étape de l'inflammation (Pruzanski et Vadas, 1991). Il a été démontré par Kennedy et ses collaborateurs que l'expression du gène de la PLA<sub>2</sub> sécrétée est induite par des molécules importantes dans les réactions inflammatoires: les endotoxines, l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 (Kennedy *et al.*, 1995).

L'IL-1 et le TNF activent la PLA<sub>2</sub> liée aux membranes ainsi que la sécrétion de la PLA<sub>2</sub> soluble extracellulaire ce qui constitue la troisième étape de l'inflammation. Plusieurs exemples démontrent la présence et l'importance de la PLA<sub>2</sub> dans le processus d'inflammation. Le choc septique chez les humains est associé avec un niveau élevé de PLA<sub>2</sub> dans le sérum. Le parasite responsable de la malaria, *Plasmodium falciparum*, cause aussi une élévation du niveau de PLA<sub>2</sub> dans le sérum. Les maladies où une grande quantité de PLA<sub>2</sub> est retrouvée dans le sang ont aussi comme caractéristique d'avoir un haut taux d'IL-1 et TNF, deux médiateurs qui pourraient induire l'élévation du niveau de PLA<sub>2</sub> lors de l'inflammation (Pruzanski et Vadas, 1991).

Finalement, la dernière étape de l'inflammation comprend entre autre la synthèse d'acide arachidonique par la PLA<sub>2</sub>, acide gras important de la réponse inflammatoire puisqu'il est un

précurseur des prostaglandines, des prostacyclines, des thromboxanes et des leukotriènes, tous des médiateurs cellulaires de la réponse immunitaire (Voet et Voet, 1995; Pruzanski et Vadas, 1991).

## **5.6 Les acides aminés importants du site catalytique**

Certains acides aminés sont très conservés parmi toutes les PLA<sub>2</sub> et dans la partie unique de la VP1 des parvovirus et font partie du site catalytique et du site de liaison du substrat de la PLA<sub>2</sub> (figure 3). Ces acides aminés sont deux acides aspartiques, une histidine, une leucine et une série de ponts disulfures.

### **5.6.1 L'acide aspartique en position 49**

Les recherches de Li et de ses collaborateurs portent sur le rôle de l'acide aminé en position 49, un acide aspartique, de la PLA<sub>2</sub> pancréatique bovine. Leurs résultats démontrent que l'Asp-49 ne jouent pas un rôle majeur dans la stabilité conformationnelle ou dans l'intégrité de la structure de la PLA<sub>2</sub>, mais cet acide aminé est essentiel pour lier l'ion calcium. Puisque la PLA<sub>2</sub> requière du calcium à son site catalytique pour effectuer la réaction, l'Asp-49 est un acide aminé essentiel pour l'enzyme (Li *et al.*, 1994).

### **5.6.2 L'acide aspartique en position 99**

Les recherches de Sekar et de ses collaborateurs portent sur un autre acide aminé important de la PLA<sub>2</sub>, l'acide aspartique en position 99. Cette fois-ci, il y a une perturbation locale de la structure donc un rôle est associé à l'Asp-99 dans la conformation de l'enzyme, mais son rôle le plus important se situe au niveau de la réaction chimique catalysée par l'enzyme. De plus, la diade H48-D99 n'est essentielle ni pour la liaison de l'enzyme avec l'interface et le substrat ni pour la liaison avec l'ion calcium (Sekar *et al.*, 1997).

### **5.6.3 Les ponts disulfures**

Les enzymes PLA<sub>2</sub> possèdent un nombre élevé de ponts disulfures: dans le cas de la PLA<sub>2</sub> pancréatique sécrétée bovine, une petite enzyme de 123 acides aminés, le contenu en résidus cystéines est de 14 pour former sept ponts. Les résultats de Zhu et de ses collaborateurs

suggèrent des rôles pour chacun de ces sept ponts. Un seul, le pont C84-C96, serait important pour le maintien de la structure tri-dimensionnelle. Les ponts disulfures sont reconnus pour leur importance au niveau de la stabilité et l'intégrité de la structure des protéines. Chez la PLA<sub>2</sub>, deux ponts semblent plus importants pour la stabilité de l'enzyme: le pont C11-C77 pour la conformation de l'enzyme et le pont C29-C45 puisqu'il fait partie de la région de liaison à l'ion calcium. Dans certains cas, d'autres acides aminés peuvent remplacer la présence d'un pont disulfure pour stabiliser la structure de l'enzyme. Par exemple, les deux ponts C44-C105 et C51-C98 relient ensemble les deux hélices principales de l'enzyme, mais ce rôle peut aussi être joué par le lien hydrogène qui unit l'histidine 48 avec l'acide aspartique 99 formant ainsi la diade catalytique (Zhu *et al.*, 1995).

#### **5.6.4 La leucine en position 31**

Les résidus qui se trouvent près ou dans la boucle de liaison au calcium sont essentiels pour la liaison avec le substrat même si le calcium n'est pas essentiel pour lier le substrat. Sa fonction se situe au niveau de l'activité catalytique de l'enzyme. Parmi ces résidus on retrouve une glycine à la position 30 (Gly-30), l'acide aspartique en position 49 (Asp-49) qui sont deux acides aminés très conservés chez les PLA<sub>2</sub> et une leucine à la position 31 (Leu-31) qui est aussi importante dans l'attachement de l'enzyme au récepteur. La leucine à la position 31 est un acide aminé important pour lier le substrat. La substitution d'une leucine pour une sérine, une thréonine ou une arginine diminue l'affinité pour le substrat plus de 100 fois, mais si il y a une mutation de la leucine pour un tryptophane, il y a une légère augmentation de l'affinité. La présence d'un résidu aliphatique ou aromatique (exemple) en position 31 maintient l'affinité de l'enzyme pour le substrat. Des résidus différents sont retrouvés à la position 31 chez différentes PLA<sub>2</sub> (Lambeau *et al.* 1995).

#### **5.7 L'inhibition de l'activité PLA<sub>2</sub>**

Étant donné que les deux formes de PLA<sub>2</sub>, sécrétée et cytosolique, jouent un rôle important au niveau de la biosynthèse de lipides médiateurs de la réponse inflammatoire, des inhibiteurs pour ces enzymes seraient très utiles comme agents anti-inflammatoires pour les patients atteints de différentes maladies inflammatoires (Hope, Chen et Morgan, 1993).

### 5.7.1 Le manoalide

Un de ces inhibiteurs est le manoalide, un produit marin naturel isolé de l'éponge *Luffariella variabilis* (Yu *et al.*, 1990). C'est un anti-inflammatoire puissant car il inactive directement la production d'eicosanoïdes par la PLA<sub>2</sub>. Cette inactivation irréversible et puissante a été démontrée pour le venin d'abeille, le venin de cobra, la neurotoxicité du  $\beta$ -bungarotoxine et la PLA<sub>2</sub> pancréatique du porc (Glaser et Jacobs, 1987). La concentration inhibitrice requise pour réduire l'activité des enzymes de 50% (CI50) a été calculée pour des PLA<sub>2</sub> provenant de différents groupes. Ainsi, le manoalide inhibe la PLA<sub>2</sub> synoviale humaine (CI50 = 0,02-0,2  $\mu$ M) (Jacobson *et al.*, 1990), la PLA<sub>2</sub> extraite du venin d'abeille (CI50 = 0,05  $\mu$ M) (Glaser et Jacobs, 1987), la PLA<sub>2</sub> provenant du venin de cobra (CI50 = 2  $\mu$ M) (Lombardo et Dennis, 1985) et la PLA<sub>2</sub> sécrétée recombinante humaine (CI50 = 4,7  $\mu$ M) (Hope, Chen et Morgan, 1993).

### 5.7.2 L'oleyloxyéthyl phosphorylcholine

Un autre inhibiteur de la PLA<sub>2</sub> utilisé est l'oleyloxyéthyl phosphorylcholine. Cet inhibiteur est un analogue de substrat spécifique et puissant de la PLA<sub>2</sub> (CI50 = 6,2  $\mu$ M pour la PLA<sub>2</sub> pancréatique de porc) (Magolda *et al.*, 1985). Il inhibe aussi la PLA<sub>2</sub> sécrétée recombinante humaine (CI50 = 13,7  $\mu$ M) de façon sélective par rapport à la PLA<sub>2</sub> cytosolique (CI50 = 1 à 14  $\mu$ M) (Hope, Chen et Morgan, 1993).

## 6. Conclusion

Les parvovirus pourraient être la cause de certaines maladies auto-immunes. La présence des acides aminés du site catalytique de la PLA<sub>2</sub> dans la VP1 des parvovirus et la présence d'anticorps anti-phospholipides chez les patients atteints de maladies auto-immunes, maladies parfois associées à une infection au B19, permet de penser qu'un lien existe entre l'infection parvovirale et maladies auto-immunes. Avant de pousser les recherches dans ce domaine, il est important de prouver l'existence d'une activité PLA<sub>2</sub> dans la capsid des parvovirus, en particulier B19 et PPV.

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

Cette section regroupe les protocoles et les méthodes utilisés lors des manipulations effectuées durant ce projet de maîtrise. Les séquences des amorces utilisées se retrouvent dans la section Amorces, la description et la provenance des produits utilisés sont regroupées dans la section Matériel et finalement, les recettes et la composition exacte des différentes solutions et différents tampons utilisés sont décrites dans la section Solutions.

## 1. Vecteurs et plasmides utilisés

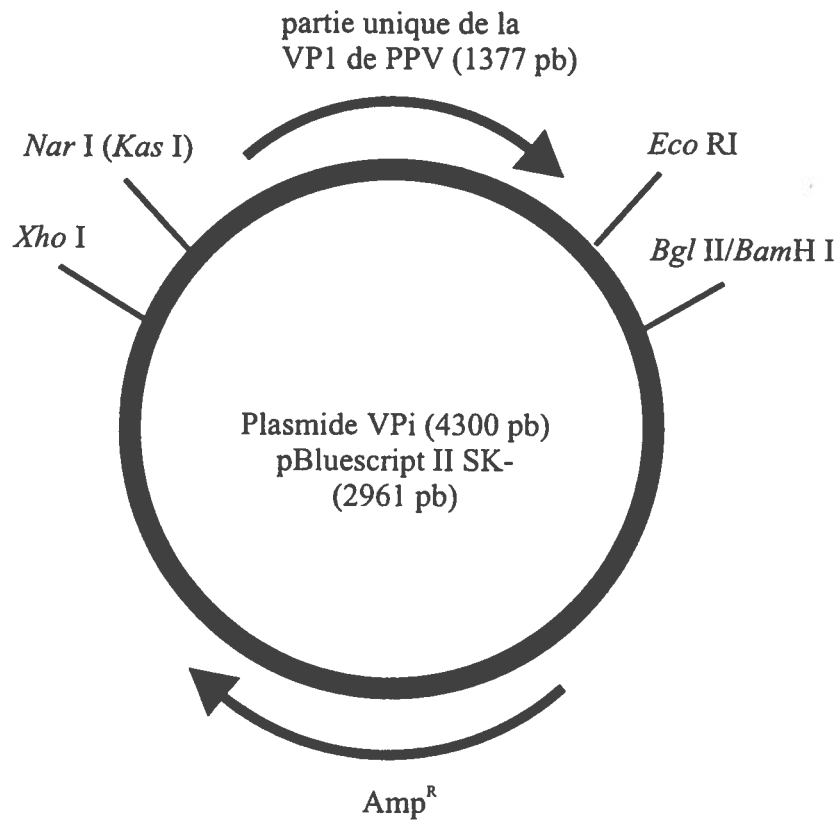
### 1.1 Clonage avec le vecteur pPROEX HTb

Un des vecteurs utilisés pour l'expression des protéines VP1 mutées était le vecteur pPROEX HTb (pPROEX<sup>TM</sup>HT Prokaryotic Expression System). Le promoteur *trc* a été modifié pour un promoteur T7 ce qui donne un contrôle plus stringent au niveau de l'expression afin de réduire la toxicité pour les cellules pendant les périodes de non-induction. Le changement de promoteur s'est fait par mutagenèse du vecteur pPROEX HTb avec les amorces T7MU5 et T7MU3. Le nouveau vecteur d'expression pT7 est ainsi obtenu. Il peut maintenant recevoir dans le site de clonage multiple, la partie unique de VP1 du PPV sans l'intron de 74 nucléotides situé au début de VP1 (2314-2389). Le début de cette partie unique se situe au codon d'initiation de VP1 (position 2287) et se termine au début de VP2 après le codon d'initiation de VP2 (ATG 2810-2812) et juste avant la séquence riche en guanines (début 2882). Le fragment cloné dans le site *Bam*H I-*Xba* I est d'environ 520 nucléotides (2287 à 2880 moins l'intron situé entre les positions 2314 et 2388). Ce nouveau plasmide, pT7 avec VP1 est maintenant prêt pour la mutagenèse. Une fois tous les mutants obtenus, l'expression des protéines mutées avec ce vecteur ne donnait pas les résultats prévus. C'est pourquoi la séquence de VP1 de type sauvage ou mutée, dans le vecteur pT7, a été transférée dans le vecteur pBAD grâce à une réaction de PCR sur les clones pT7-VP1 de type sauvage ou mutés qui permettait le sous-clonage avec les enzymes *Bam*H I et *Xho* I dans le vecteur pBAD modifié (digéré avec *Bgl* II et *Xho* I) (voir section 3 de ce chapitre).

### 1.2 Le plasmide VPi

Un deuxième plasmide, le plasmide VPi, est utilisé pour la mutagenèse (figure 4). La séquence de la protéine VP1 présente dans ce plasmide sera ensuite sous-clonée dans le clone infectieux pN2 qui servira pour la transfection de cellules PT (Porcine Testis). Le vecteur utilisé

**Figure 4** Carte du plasmide VPi: vecteur pBluescript avec la partie unique de la protéine VP1 du PPV.



Vecteur pBluescript II SK-: 2961 paires de bases

Partie unique de la protéine VP1 du PPV cloné dans la site de clonage multiple du pBluescript avec les enzymes *Xho I* et *Bgl II* (1377 paires de bases)

Plasmide VPi: vecteur pBS de 2961 pb + VP1 1377 pb = 4300 paires de bases

*Nar I (Kas I)* et *Eco RI*: enzymes servant au sous-clonage de VP1 dans le clone infectieux pN2



pour obtenir le plasmide VPi est le pBluescript II SK- (2961 paires de bases). La séquence de la protéine VP1 clonée dans ce vecteur va du nucléotide 2287 (site de la méthionine et du site de restriction *Nar* I) au nucléotide 3664 (site de restriction de l'enzyme *Bgl* II). L'intron de la VP1, à la position 2314 à 2388, est conservé. Le plasmide total, composé du vecteur de 2961 pb et de la séquence de VP1 de 1377 pb donnent un total de 4300 paires de bases. Le fragment VP1 est cloné à l'intérieur des sites *Xho* I et *Bam*H I du vecteur pBluescript. La digestion se fait avec les enzymes *Bgl* II et *Xho* I. *Bgl* II est présent à la fin du fragment dans le génome du PPV (position 3664) et *Xho* I a été rajouté par PCR avec les amorces PPVP15 et PPVP13 pour permettre le clonage.

### 1.3 Le sous-clonage dans le clone infectieux pN2

Le sous-clonage dans le clone infectieux se fait à l'aide des enzymes *Kas* I (isoschizomère de *Nar* I) et *Eco*R I, site de restriction situé à la position 3590 du génome, ce qui libère le fragment muté pour le transférer dans le clone infectieux qui est digéré avec les mêmes enzymes. L'enzyme *Kas* I est un isoschizomère de *Nar* I. *Kas* I reconnaît la séquence 5'-G↓GCGCC-3' (↓ position du clivage) tandis que *Nar* I clive de la façon suivante: 5'-GG↓CGCC-3'. *Kas* I est une enzyme plus efficace que *Nar* I.

### 1.4 Le clone infectieux pN2

Le clone infectieux est un plasmide dans lequel a été inséré le génome complet d'un virus et qui, après transfection dans des cellules susceptibles, reproduit le virus. Lorsqu'il est transfecté dans une cellule, elle peut produire des virus complets car elle possède toute l'information nécessaire. Le clone infectieux pN2 provient d'un vecteur pUC19 dans lequel a été inséré le génome complet de la souche NADL-2 du PPV dans le site de restriction de l'enzyme *Sma* I (Bergeron, Menezes et Tijssen, 1993). Le clone infectieux pN2 a été modifié pour éliminer des sites de restrictions retrouvés à la fois dans le vecteur pUC19 (2686 paires de bases) et dans le génome viral (5075 paires de bases). Un fragment de 477 paires de bases a été retiré du vecteur entre les sites de restrictions des enzymes *Aat* II (position 2617) et *Kpn* I (position 408). Le site *Kpn* I est toujours présent. Ce nouveau clone infectieux peut maintenant accueillir plus facilement les séquences de VP1 mutées dans le plasmide VPi.

## 2. Mutagenèse dirigée

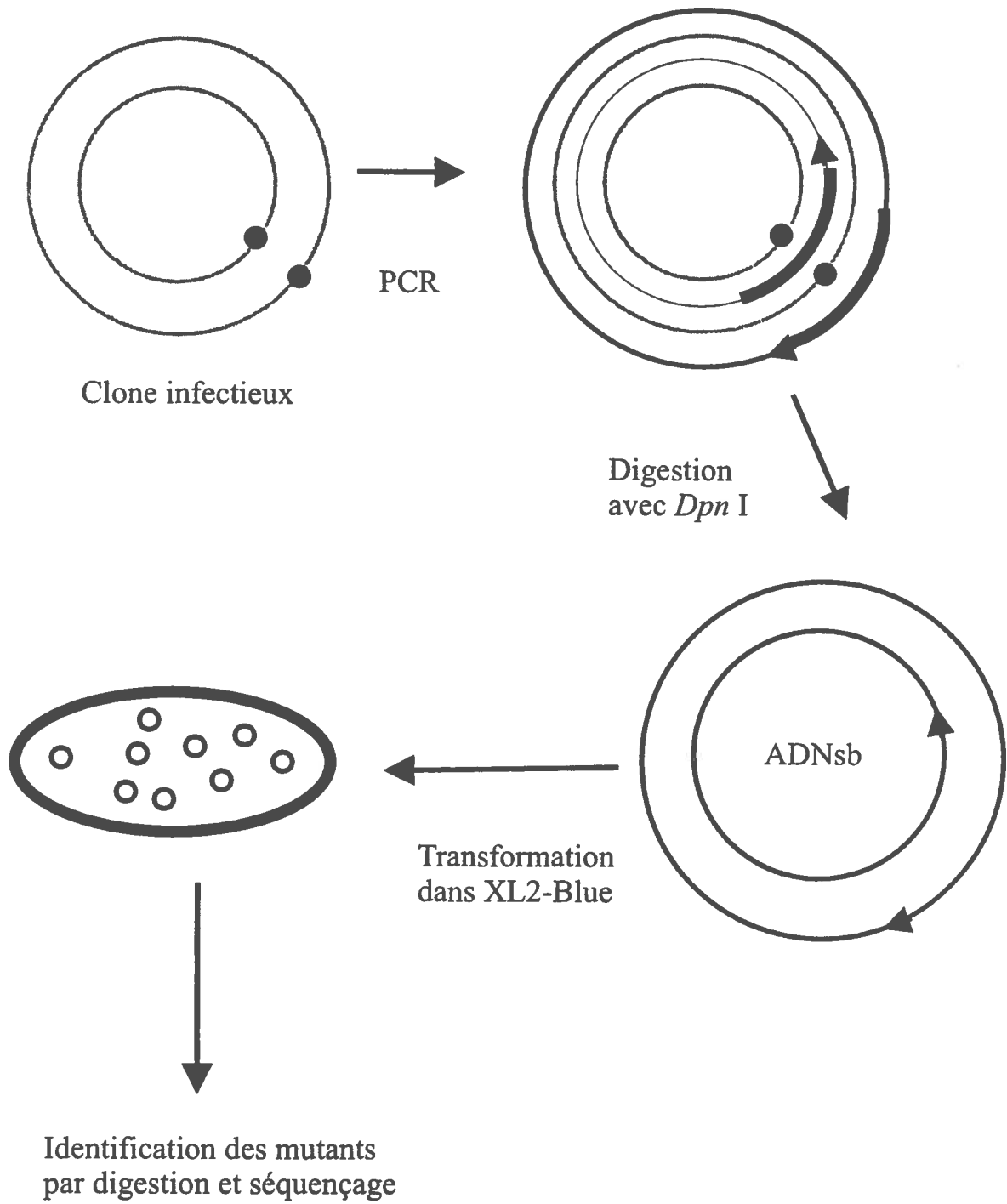
### 2.1 Introduction

Pour pouvoir vérifier la présence d'une activité PLA<sub>2</sub> dans la partie unique de la protéine VP1 du PPV, il faut obtenir des clones mutés et non mutés qui pourront être exprimés et dont l'activité pourra être mesurée. Les mutations sont effectuées grâce au protocole QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit Instruction Manual de Stratagene Cloning Systems. La mutagenèse dirigée utilise deux amorces complémentaires de 25 à 45 nucléotides avec la ou les mutations voulues situées au milieu de l'amorce. Ces amorces vont s'apparier avec l'ADN à muter après la séparation des deux brins du plasmide à température élevée. Grâce à la polymérase d'ADN et les nucléotides ajoutés, il y a synthèse de brins complémentaires mutés complets. Ces nouvelles molécules d'ADN sont linéaires et simples brins car il n'y a pas de ligase dans la réaction de PCR (figure 5). Les différentes mutations ainsi que les amorces correspondantes se trouvent dans la section Amorces.

### 2.2 Réaction de PCR

La mutagenèse se fait par PCR et chaque réaction de PCR est constituée de 5 µL de tampon de réaction 10X pour *Pfu*, 1 µL d'ADN double brin (5 ng à 50 ng), 1 µL (125 ng) de chacune des amorces, 1 µL de dNTP 10 mM et 41 µL d'eau pour un total de 50 µL de réaction dans des tubes de 0,5 mL "Thin-Wall" de Stratagene. Le contenu des tubes est bien mélangé avant d'y ajouter 1 µL de polymérase d'ADN native *Pfu* (2,5 U/µL) isolée de *Pyrococcus furiosus*. Cette enzyme est utilisée en mutagenèse car elle possède le plus faible taux d'erreurs de toutes les polymérases d'ADN thermostables étudiées. Dans le thermocycleur TOUCHDOWN™ de Hybaid, le programme suivant est utilisé pour effectuer la réaction de PCR: 1 cycle à 95°C pendant 30 secondes suivi de 20 cycles comprenant chacune des 3 étapes suivantes: 95°C pour 30 secondes, 55°C pour 1 minute et 68°C pour 18 minutes. Le premier cycle à 95°C permet à l'ADN double brin de se dissocier pour permettre ensuite l'appariement des amorces à 55°C. À 68°C, il y a élongation du brin d'ADN: cette partie du cycle se doit d'être assez longue pour permettre la synthèse complète d'un brin complémentaire à chacun des deux brins du plasmide. Il faut donc calculer deux minutes d'élongation pour chaque 1000 paires de bases du plasmide pour s'assurer que la polymérase ait le temps de copier le plasmide en entier.

**Figure 5** Schématisation du protocole de mutagenèse dirigée.



QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit,  
Manuel d'instruction, Stratagen, 1995, p2.

### 2.3 Digestion et transformation du produit de PCR

Après la réaction de PCR effectuée, il y a digestion en ajoutant 1  $\mu\text{L}$  d'enzyme *Dpn* I (10 U/ $\mu\text{L}$ ) et en incubant à 37°C pendant une heure. Ceci permet de digérer l'ADN parental double brin car l'enzyme reconnaît une courte séquence de quatre nucléotides dont un méthylé ( $\text{GA}^{\text{m}}\downarrow\text{TC}$ ) retrouvée à plusieurs endroits dans la séquence d'un ADN double brin méthylé: l'ADN parental est méthylé car il a été extrait d'une culture bactérienne tandis que l'ADN muté est simple brin non méthylé puisqu'il provient d'une réaction de PCR. L'ADN digéré est ensuite transformé dans les cellules ultra-compétentes Epicurian Coli XL2-Blue. Les cellules XL2 conservées à -70°C sont décongelées sur la glace avant que 40  $\mu\text{L}$  soient transférés dans un tube de polypropylène de 15 mL Falcon® 2059 auquel est ajouté 1  $\mu\text{L}$  d'ADN digéré avec *Dpn* I. Le mélange ADN-cellules XL2 est incubé sur glace pendant 30 minutes avant de passer au choc thermique dans un bain à 42°C pendant 30 secondes. Il y a ensuite incubation sur glace pour deux minutes. 0,5 mL de milieu NZY+broth pré-incubé à 42°C est ajouté avec ensuite une incubation de la transformation à 37°C pendant une heure avec une agitation de 250 rpm. Tout le volume (environ 550  $\mu\text{L}$ ) est étalé sur une gélose LB-Agar avec 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  d'ampicilline qui est ensuite incubée 16 heures à 37°C. Une vérification de la présence de la mutation dans l'ADN des colonies obtenues est effectuée grâce à la méthode de minipréparation d'ADN rapide UFX.

### 2.4 Minipréparation d'ADN rapide "UFX"

Dans un tube de 15 mL, 2 mL de milieu LB avec ampicilline 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sont inoculés à l'aide d'une colonie mutante et le tube est incubé 16 heures à 37°C avec une agitation de 250 rpm. 200  $\mu\text{L}$  de culture sont transférés dans un tube de 1,5 mL auquel sont ajoutés 200  $\mu\text{L}$  de solution de lyse. La réaction de lyse est arrêtée avec 200  $\mu\text{L}$  de solution de neutralisation avant d'être centrifugée 3 minutes à 14 000 rpm. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube de 1,5 mL contenant 500  $\mu\text{L}$  d'isopropanol 100%. Il y a centrifugation 2 minutes à 14 000 rpm, le surnageant est rejeté et le culot d'ADN est rincé avec 500  $\mu\text{L}$  d'éthanol 70%. Après une centrifugation d'une minute à 14 000 rpm, l'éthanol est rejeté et le culot est séché à la température de la pièce. Le culot est resuspendu dans 40  $\mu\text{L}$  d'eau stérile avec 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de RNase A et mélangé au vortex. Environ 10% (4-5  $\mu\text{L}$ ) d'ADN dilué est nécessaire pour la digestion (protocole inspiré de Cormack et Somssich, 1997).

## 2.5 Identification des mutants

Certaines mutations ont été développées de façon à ce qu'un site de restriction voisin du site de mutation soit délété ou ajouté. La vérification de la présence de la mutation se fait donc par la vérification de la présence ou l'absence du site de restriction après digestion avec l'enzyme de restriction en cause. Il y a ensuite vérification par séquençage de la présence de la mutation voulue. Certaines mutations peuvent seulement être identifiées par séquençage. Les mutants P31L, P31R, P31W, H48A, D49N et HD48AN ne peuvent être vérifiés que par séquençage tandis que le mutant D42E obtient un site de restriction *Pst* I supplémentaire suite à la mutagenèse et le mutant D42N obtient pour sa part un site de restriction *Pvu* II supplémentaire. Les deux mutations D99A et D99N perdent leur site de restriction *Pvu* II suite à la mutation. Ces quatre dernières mutations seront donc vérifiées par digestion avant que la séquence soit confirmée par séquençage.

## 2.6 Vérification par digestion sur gel d'agarose

### 2.6.1 Gel d'agarose

La digestion est vérifiée sur un gel d'agarose. Pour un gel de 0,8% d'agarose, il faut peser 0,8 g d'agarose qui est ensuite dissout dans 100 mL d'eau distillée dans un erlenmeyer placé au four à micro-ondes pour 2 à 3 minutes à la puissance maximale en agitant après chaque minute. La solution doit refroidir avant d'être coulée dans un moule de la longueur et de la largeur appropriées avec un peigne comportant 8 à 30 puits. Pour vérifier les digestions suite à une mutagenèse, il faut utiliser un gel de 15x10 cm et un peigne de 30 puits. Le bain contient le tampon TAE nécessaire pour faire circuler le courant à travers le gel. 1  $\mu$ L de tampon de chargement III 6X est ajouté à chaque échantillon de 10  $\mu$ L avant d'être déposés dans un puit. Ce dernier est soumis à un courant de 100 volts provenant d'une source d'alimentation électrique pendant environ une heure. Le gel est coloré dans une solution de bromure d'éthide de 10  $\mu$ g/mL pendant 20 minutes avant d'être visionné à l'aide de lampes à rayons ultra-violet. Le gel est photographié puis analysé pour choisir les clones mutants.

## 2.6.2 Digestion des mutants

Les mutants D42E (ajout de *Pst* I), D42N (ajout d'un site *Pvu* II), D99A (perte d'un site *Pvu* II) et D99N (perte d'un site *Pvu* II) sont digérés avec *Pst* I ou *Pvu* II selon le cas. La digestion requière 5 µL d'ADN, 1 µL de tampon de réaction ("React Buffers", 10X, de Gibco BRL, #2 pour *Pst* I et #6 pour *Pvu* II), 0,2 µL d'enzyme (*Pst* I ou *Pvu* II) et 3,8 µL d'eau pour un total de 10 µL de réaction incubée une heure à 37°C. Le volume total de chaque digestion, auquel est ajouté 1 µL de solution de coloration, est déposé dans les puits du gel d'agarose. Pour identifier les mutants par exemple, l'enzyme *Pvu* II coupe le vecteur VPi à trois endroits (trois bandes sur le gel) donc les clones positifs pour les mutations D99A et D99N ne présenteront que deux bandes sur le gel. Dans le cas du mutant D42N dans le plasmide VPi, quatre bandes d'ADN seront présentes sur le gel pour identifier un clone mutant (tableau II).

## 2.7 Vérification par séquençage

Les clones mutants choisis sont repiqués dans 3 mL de milieu LB avec ampicilline dans des tubes de 15 mL et incubés à 37°C pendant 16 heures avec une agitation de 250 rpm. Pour effectuer une minipréparation d'ADN qui servira pour le séquençage, la trousse de purification d'ADN Qiagen Plasmid Mini Kit est utilisée. Le séquençage des clones mutants est effectué par le service de séquençage de l'INRS-Institut-Armand-Frappier avec le système ABI de Perkin Elmer. Les clones mutants dans le plasmide VPi sont séquencés avec l'amorce PPV-PR61 située dans l'intron de la séquence de la protéine VP1 (2345-2363). Étant donné que le plasmide pT7-VP1 ne contient plus l'intron, l'amorce PPVP15 est utilisée. Cette amorce débute juste avant le codon d'initiation de la protéine VP1 et sert à ajouter un site de restriction *Xho* I au début de la protéine VP1.

## 3. Système d'expression pBAD/TOPO® ThioFusion™

### 3.1 Généralités

Le système d'expression pBAD/TOPO® ThioFusion™ d'Invitrogen utilise un vecteur linéarisé, activé grâce à la topoisomérase I et qui possède des extrémités 3' simples brins d'une seule base: une thymidine. La ligation se fait avec un produit de PCR ou un fragment d'ADN double brin possédant des extrémités 3' simples brins composés cette fois-ci d'une adénosine. Les

**Tableau II** Méthodes d'identification des mutants selon la mutation et le plasmide utilisés.



Mutations	VPI	Amorce	pT7-VPI	Amorce
P31L	séquençage	PPV-PR61	séquençage	PPVP15
P31R	séquençage	PPV-PR61	séquençage	PPVP15
P31W	séquençage	PPV-PR61	séquençage	PPVP15
D42E	digestion avec <i>Pst</i> I et séquençage	PPV-PR61	digestion avec <i>Pst</i> I et séquençage	PPVP15
D42N	digestion avec <i>Pvu</i> II et séquençage	PPV-PR61	digestion avec <i>Pvu</i> II et séquençage	PPVP15
H48A	séquençage	PPV-PR61	séquençage	PPVP15
D49N	séquençage	PPV-PR61	séquençage	PPVP15
HD48AN	séquençage	PPV-PR61	séquençage	PPVP15
D99A	digestion avec <i>Pvu</i> II et séquençage	PPV-PR61	digestion avec <i>Pvu</i> II et séquençage	PPVP15
D99N	digestion avec <i>Pvu</i> II et séquençage	PPV-PR61	digestion avec <i>Pvu</i> II et séquençage	PPVP15

deux topoisomérases I sont éliminées du vecteur au moment de la ligation. Les plasmides sont ensuite transformés dans des cellules compétentes TOP10 One-Shot™.

### 3.2 Modifications du vecteur pBAD

#### 3.2.1 Ajout d'un site de clonage multiple

Pour modifier le vecteur pBAD en ajoutant un site de clonage multiple, deux oligonucléotides (POLIL5 et POLIL3) complémentaires appariés formant une courte molécule d'ADN de 31 paires de bases sont utilisés (figure 6). Une fois appariés, les deux oligonucléotides forment le site de clonage multiple suivant:

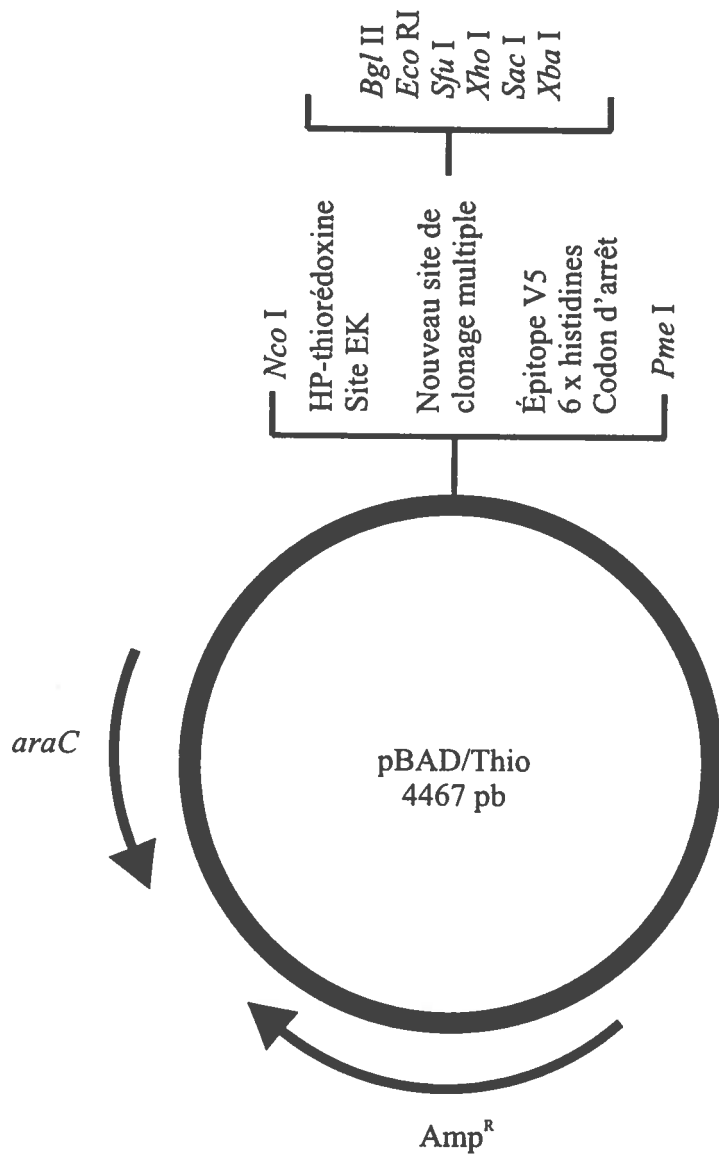
```
5'   AGA TCT GAA TTC GAA CTC GAG CTC TCT AGA A 3'
3'   A TCT AGA CTT AAG CTT GAG CTC GAG AGA TCT   5'
```

Pour effectuer l'appariement des deux oligonucléotides, il faut préparer la réaction suivante: 6 µL de chacune des deux oligonucléotides (POLIL5 et POLIL3, toutes deux ayant une concentration de 1 µg/µL), 1 µL de tampon de digestion One-Phor-All 10X pour une concentration finale de 0,5X et 7 µL d'eau stérile pour un total de 20 µL de réaction dans un tube à PCR de 0,5 mL Sarstedt. La réaction s'effectue à 90°C pendant trois minutes dans un thermocycleur. La réaction est refroidie lentement à la température de la pièce. 1 µL de la réaction est utilisé pour effectuer la ligation.

#### 3.2.2 Insertion du nouveau fragment dans pBAD

La ligation entre le vecteur pBAD linéarisé et le nouveau fragment d'ADN obtenu se fait grâce à la réaction suivante: 1 µL d'ADN et 1 µL de vecteur pBAD/Thio-TOPO sont ajoutés à 3µL d'eau stérile pour un total de 5 µL. La réaction s'effectue à la température de la pièce (environ 25°C) pendant cinq minutes. La réaction est arrêtée avec 1 µL de la solution d'arrêt "6X TOPO Cloning Stop Solution", mélangée 10 secondes à la température de la pièce et déposée ensuite sur la glace. La solution d'arrêt favorise la dissociation de la topoisomérase I du vecteur. La prochaine étape consiste à transformer le plasmide obtenu dans les cellules compétentes TOP10. 2 µL de la réaction de ligation sont déposés dans un tube de cellules compétentes TOP10 et le mélange est incubé sur glace pendant 30 minutes. Le choc thermique s'effectue dans un bain à 42°C pendant 30 secondes sans agitation. La réaction est replacée ensuite sur la glace quelques

**Figure 6** Carte du vecteur pBAD/Thio avec un nouveau site de clonage multiple.



5' AGA TCT GAA <u>TTC GAA</u> CTC GAG CTC TCT AGA A 3'	
Séquences	Enzymes
AGA TCT	<i>Bgl</i> II, <i>Xho</i> II, <i>Mfl</i> I, <i>Bst</i> YI
GAA TTC	<i>Eco</i> RI, <i>Fsi</i> I
<u>TTC GAA</u>	<i>Sfu</i> I
CTC GAG	<i>Xho</i> I, <i>Ava</i> I
GAG CTC	<i>Sac</i> I
<u>TCT AGA</u>	<i>Xba</i> I

minutes avant que 250  $\mu\text{L}$  de milieu SOC à la température de la pièce soient ajoutés. Tout le volume de la réaction est étendu sur une gélose LB-Agar contenant 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  d'ampicilline. La gélose est placée dans un incubateur à 37°C pendant 16 heures. Huit colonies sont repiquées dans 2 mL de milieux LB avec ampicilline (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) dans des tubes de 15 mL incubés à 37°C pendant 16 heures avec agitation (250 rpm).

### 3.2.3 Vérification de la modification

À partir des huit tubes de cultures bactériennes, huit minipréparations d'ADN sont effectuées. 1,5 mL de culture est transféré dans un tube de 1,5 mL et le tube est centrifugé pendant 30 secondes à 13 000 rpm dans une microcentrifugeuse de table. Le surnageant est rejeté et le culot est resuspendu dans 300  $\mu\text{L}$  de solution de ressuspension. Ensuite, 300  $\mu\text{L}$  de solution de lyse sont ajoutés, le tube est inversé 5 fois pour mélanger et incubé à la température de la pièce pendant 5 minutes. La lyse est arrêtée avec 300  $\mu\text{L}$  de solution de neutralisation et le tout est mélangé par inversion avant d'être incubé sur la glace pendant 10 minutes. Les tubes sont centrifugés 10 minutes à 13 000 rpm et le surnageant est transféré dans un tube de 1,5 mL contenant 500  $\mu\text{L}$  d'isopropanol 100%. Après avoir été inversés, les tubes sont centrifugés 15 minutes à 13 000 rpm. Le surnageant est éliminé et le culot est rincé avec 500  $\mu\text{L}$  d'éthanol 70% avant d'être recentrifugé pendant 2 minutes à 13 000 rpm. Le surnageant est éliminé et le culot est séché à température de la pièce. Le culot est resuspendu ensuite dans 40  $\mu\text{L}$  d'eau stérile.

### 3.2.4 Digestion

L'ADN purifié obtenu doit être digéré avec les enzymes *Nco* I et *Xba* I pour confirmer la présence de l'insertion: le nouveau site de clonage multiple. L'enzyme *Nco* I (position 344 dans pBAD) coupe le vecteur pBAD environ 375 nucléotides avant le site d'insertion (718) et l'enzyme *Xba* I se retrouve à la fin du site de clonage multiple (31 nucléotides). Le résultat de la digestion devrait être un fragment d'environ 400 paires de bases. La digestion s'effectue en mélangeant 15  $\mu\text{L}$  de la minipréparation d'ADN avec 0,3  $\mu\text{L}$  de chacune des enzymes *Nco* I et *Xba* I, 2,5  $\mu\text{L}$  de tampon de réaction "Sure/Cut H" et 11,9  $\mu\text{L}$  d'eau stérile pour un total de 25  $\mu\text{L}$  de réaction qui est incubée une heure à 37°C. La digestion est vérifiée sur un gel de 1,5% d'agarose avec 0,5% d'agarose à bas point de fusion. Pour vérifier la taille des bandes, le marqueur à échelle multiple 100 pb est utilisé. Les deux clones positifs, #7 et #8, sont repiqués

dans 3 mL de milieu LB avec ampicilline et incubés 16 heures à 37°C avec 250 rpm d'agitation. Ces cultures servent à effectuer une minipréparation d'ADN à l'aide de la trousse pour minipréparations d'ADN Qiagen Miniprep Kit. Ces deux minipréparations servent pour le séquençage car il est important de vérifier l'orientation du fragment. Le clone #8 possède le fragment inséré selon l'orientation voulue, il sera donc utilisé pour la prochaine étape qui consiste à ajouter un autre petit fragment d'ADN contenant la séquence du site de clivage de la protéase recombinante rTEV.

### 3.2.5 Deuxième modification au vecteur pBAD

Le fragment est inséré dans le site de restriction de l'enzyme *Bgl* II qui provient du nouveau site de clonage multiple (figure 7). Encore une fois, c'est grâce à deux oligonucléotides (TEV5 et TEV3) appariés que le fragment est obtenu. Pour appairer les deux oligonucléotides, il faut 17 µL de chacun des deux oligonucléotides (leur concentration est d'environ 80 pmol/µL, 17 µL donne donc environ 10 µg d'ADN), 2 µL de tampon de digestion One-Phor-All 10X (concentration finale de 0,5X) et 4 µL d'eau pour un total de 40 µL de réaction qui est incubée à 90°C pendant trois minutes dans un thermocycleur. La température de la réaction descend ensuite tranquillement jusqu'à la température de la pièce (environ 25°C).

Une fois les deux oligonucléotides appariés, le fragment obtenu est le suivant:

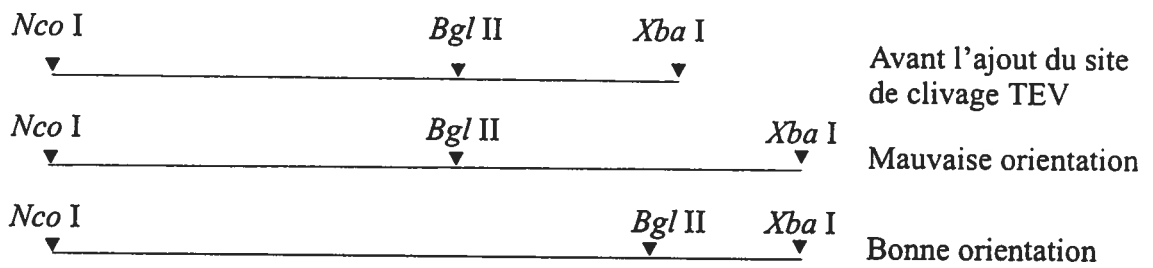
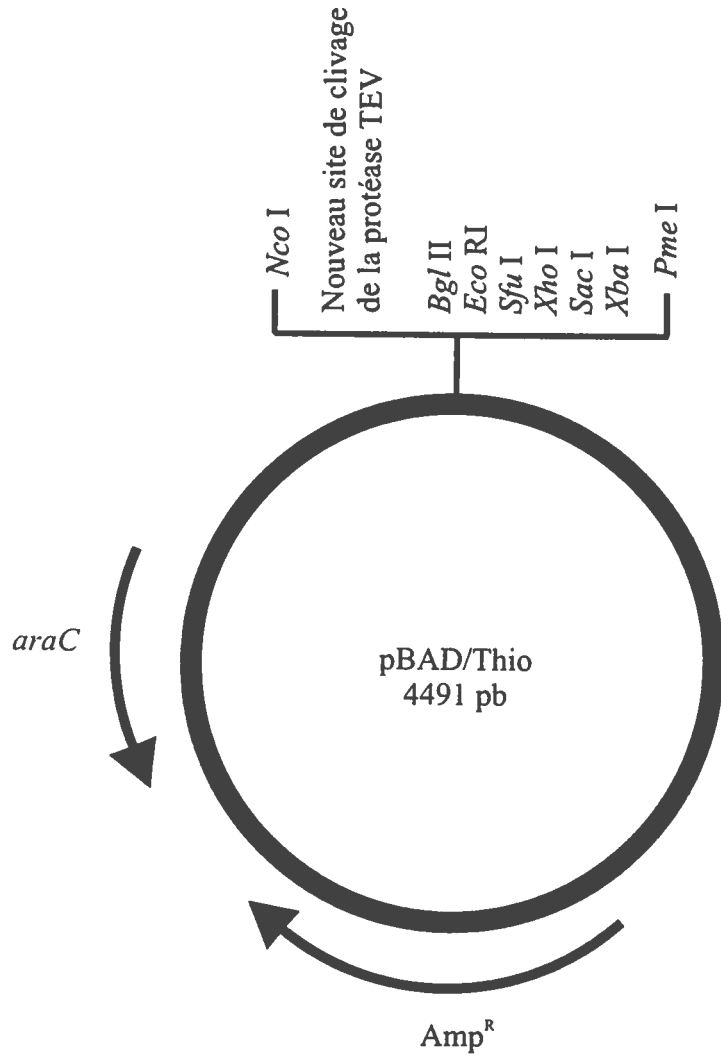
```
5' GAT CCG AAA ACC TGT ATT TTC AGG GCA
    GC TTT TGG ACA TAA AAG TCC CGT CTA G 5'
```

Les extrémités peuvent s'apparier avec les extrémités qui seront obtenues après la digestion du vecteur avec l'enzyme *Bgl* II. Cependant, lors de la ligation, seul le côté droit du fragment ci-dessus conservera le site de restriction *Bgl* II. Ceci permettra de confirmer par digestion l'orientation du fragment.

### 3.2.6 Insertion du site de clivage de la protéase TEV

La digestion du vecteur s'effectue de la façon suivante: 2 µL (400 ng) d'ADN (clone #8), 1 µL d'enzyme *Bgl* II, 4 µL de tampon de digestion One-Phor-All 10X et 13 µL d'eau pour un total de 20 µL de réaction qui est incubée à 37°C pendant une heure et ensuite inactivée à 85°C pendant 30 minutes. La ligation du vecteur pBAD avec le fragment TEV se fait grâce à la réaction suivante: 20 µL du fragment TEV (5 µg), 2 µL du vecteur pBAD digéré, 8 µL du tampon

**Figure 7** Carte du vecteur pBAD/Thio avec le nouveau site de clonage multiple et un nouveau site de clivage pour la protéase TEV.





de ligation 5X, 1  $\mu\text{L}$  de ligase d'ADN T4 et 9  $\mu\text{L}$  d'eau pour un total de 40  $\mu\text{L}$  de réaction de ligation qui est incubée pendant une heure à la température de la pièce. 1  $\mu\text{L}$  du produit de ligation est utilisé pour l'électroporation dans 40  $\mu\text{L}$  de cellules Sure électro-compétentes (voir section Cellules électro-compétentes et Électroporation).

### 3.2.7 Vérification de la présence du site de clivage de la protéase TEV

Plusieurs minipréparations d'ADN sont effectuées et les clones obtenus sont digérés avec les enzymes *Nco* I et *Bgl* II. Lors de la ligation, les extrémités du fragment inséré ont permis de conserver seulement un site de restriction *Bgl* II. En digérant avec *Nco* I et *Bgl* II, les clones donneront deux petits fragments différents. C'est la différence de taille entre les différents clones et le plasmide sans l'insertion qui permettra d'identifier les clones positifs. Si l'insert est dans la bonne orientation, la digestion donnera un petit fragment d'ADN de 400 paires de bases, 24 paires de bases de plus qu'un fragment obtenu d'un clone où l'insert est dans le sens inverse. Tout comme pour la modification précédente, il est important de confirmer les résultats de la digestion en séquençant le clone positif. L'amorce utilisée dans ce cas est "pBAD Reverse Sequencing Primer", amorce située après l'insert, en position 854 à 871.

## 3.3 Clonage dans pBAD

Les clones mutants obtenus à l'aide de la méthode de mutagenèse dirigée QuickChange Site-Directed Mutagenesis sur les clones pT7-VP1 contenant le cadre de lecture de la VP1 sont utilisés pour effectuer un PCR avec les amorces FPOVP15 et FPOVP133 afin d'obtenir des fragments d'ADN mutés pouvant être clonés dans le nouveau plasmide pBAD-TEV.

### 3.3.1 Réaction de PCR

Les réactions de PCR suivent la recette suivante: 1  $\mu\text{L}$  d'ADN, 1  $\mu\text{L}$  de l'amorce 5', 1  $\mu\text{L}$  de l'amorce 3', 1  $\mu\text{L}$  du mélange dNTP, 10  $\mu\text{L}$  de tampon de réaction pour la *Pfu* et 86  $\mu\text{L}$  d'eau pour un total de 100  $\mu\text{L}$  auquel est ajouté 1  $\mu\text{L}$  de la polymérase d'ADN *Pfu*. Le programme utilisé dans le thermocycleur Touchdown™ de Hybaid est le suivant: un premier cycle à 95°C pendant 2 minutes, ensuite 32 cycles de trois segments: 95°C pendant 45 secondes, 55°C pendant 45 secondes et 72°C pendant 45 secondes et finalement, un dernier cycle à 72°C pendant 10

minutes. Les produits de PCR sont vérifiés sur gel d'agarose de 0,8% où des bandes à environ 500 paires de bases devraient apparaître. Les produits de PCR positifs sont digérés avec les enzymes *BamH I* et *Xho I* pour être insérés dans le plasmide pBAD-TEV digéré avec les enzymes *Bgl II* et *Xho I*. Avant de digérer les produits de PCR, ces derniers doivent être précipités pour éliminer les amorces, les dNTP, l'enzyme et les sels provenant du tampon de réaction.

### 3.3.2 Précipitation d'ADN

Il faut ajouter de l'acétate de sodium 3 M pour obtenir une concentration finale de 0,3 M et ajouter 2,5 volumes d'éthanol 100% à la solution d'ADN à précipiter et ensuite mélanger au vortex pendant 10 secondes. La solution est laissée à la température de la pièce (25°C) pendant cinq minutes avant d'être centrifugée 15 minutes à 14 000 x g dans une microcentrifugeuse. Le surnageant est rejeté et le culot est lavé avec 1 mL d'éthanol 70% avant d'être recentrifugé 10 minutes à 14 000 x g. À nouveau, le surnageant est rejeté et le culot est laissé à l'air libre pour sécher. Un volume désiré d'eau est ajouté selon la concentration initiale d'ADN et selon la concentration voulue d'ADN. Pour précipiter les produits de PCR obtenus, il faut ajouter 18 µL d'acétate d'ammonium et 270 µL d'éthanol 100% aux 90 µL d'ADN. Après précipitation, le culot est resuspendu dans 50 µL d'eau.

### 3.3.3 Digestion des produits de PCR

La première digestion est effectuée pour tous les produits de PCR selon la recette suivante: 25 µL d'ADN (produit de PCR précipité), 4 µL d'enzymes (2 µL *BamH I* et 2 µL *Xho I*), 10 µL de tampon de digestion One-Phor-All 10X (concentration finale 2X) et 11 µL d'eau pour un total de 50 µL de réaction qui est incubée pendant une heure et demie à 37°C et inactivée 30 minutes à 85°C.

### 3.3.4 Digestion du vecteur pBAD modifié

La digestion du plasmide pBAD-TEV est effectuée en utilisant 2 µL d'ADN, 1 µL d'enzymes (0,5 µL *Bgl II* et 0,5 µL *Xho I*), 4 µL de tampon de digestion One-Phor-All 10X (concentration finale 2X) et 13 µL d'eau pour un total de 20 µL de réaction incubée pendant une heure et demie à 37°C et inactivée 30 minutes à 85°C. Il peut maintenant y avoir ligation des

produits de PCR digérés avec le plasmide digéré en suivant la recette suivante: 2  $\mu\text{L}$  du plasmide, 20  $\mu\text{L}$  du produit de PCR, 8  $\mu\text{L}$  de tampon de ligation 5X, 0,5  $\mu\text{L}$  de ligase et 9,5  $\mu\text{L}$  d'eau pour un total de 40  $\mu\text{L}$  de réaction de ligation qui est incubée à la température de la pièce pendant une heure. 1  $\mu\text{L}$  du produit de ligation est utilisé pour l'électroporation dans 40  $\mu\text{L}$  de cellules Sure électrocompétentes.

### 3.3.5 Production de cellules compétentes pour électroporation

À partir d'une colonie, 3 mL de milieu LB avec les antibiotiques appropriés sont inoculés dans un tube de 15 mL qui est incubé à 37°C pendant 16 heures avec une agitation de 250 rpm. 1 mL de culture est utilisé pourensemencer un litre de milieu LB dans un erlenmeyer de 2 litres sans antibiotique. Cette culture est incubée à 37°C avec agitation pendant 1 à 2 heures, jusqu'à une densité optique de 0,5 à 1 à une longueur d'onde de 600 nm. Une fois la densité optique atteinte, la culture est transférée dans 4 tubes à centrifugation de 250 mL qui sont déposés sur glace pour ensuite être centrifugés à 4°C pendant 15 minutes à 4000 x g dans une centrifugeuse Sorvall. Le surnageant est rejeté et le culot est resuspendu au vortex. 250 mL d'eau stérile à 4°C remplissent les tubes qui sont recentrifugés 15 minutes, 4000 x g, 4°C. Les culots sont resuspendus au vortex, 10 mL d'eau stérile à 4°C sont ajoutés puis les volumes sont rassemblés dans un tube rempli ensuite avec de l'eau jusqu'à 200 mL. Il y a recentrifugation (15 minutes, 4000 x g, 4°C) et les culots sont resuspendus dans 3 mL de glycérol 10% stérile à 4°C. Des tubes de 1,5 mL sont remplis avec 80  $\mu\text{L}$  de cellules compétentes et les tubes sont conservés à -70°C.

### 3.3.6 Électroporation

Pour chaque réaction d'électroporation, une cuvette 1 mm stérile ou rincée à l'éthanol puis séchée sous la hotte biologique est utilisée (BTX Disposable Cuvettes). Les cuvettes stériles sont conservées sur la glace pour un minimum d'une minute. Dans un tube 1,5 mL, 1  $\mu\text{L}$  de produit de ligation est ajouté à 40  $\mu\text{L}$  de cellules électrocompétentes puis le mélange est transféré dans une cuvette à électroporation placée ensuite dans le support de cuvettes "Cuvette Holder PEP™". L'électroporateur "BTX ECM®395 Electroporation System" est ajusté à 1500 Volts pour 5 msec. 500  $\mu\text{L}$  de milieu SOC sont ajoutés et bien resuspendus en pipettant. De 1 à 100  $\mu\text{L}$  sont étalés ensuite sur une gélose LB-Agar contenant les antibiotiques servant à la sélection.

Les protocoles de cellules électrocompétentes et d'électroporation sont élaborés à partir des protocoles pour la production de cellules électrocompétentes et pour l'électroporation de *E. coli* DH5 $\alpha$  et DH1 avec le plasmide pUC12 provenant du manuel d'instruction pour l'utilisation du système d'électroporation BTX ECM@395, BTX, San Diego, CA, USA.

### **3.4 Expression dans pBAD**

#### **3.4.1 Induction avec arabinose**

À l'aide d'une colonie, 3 mL de milieu LB avec ampicilline 100  $\mu\text{g/mL}$  sont inoculés et incubés 16 heures à 37°C avec agitation, 250 rpm. Ensuite, 50 mL de milieu LB avec ampicilline dans un erlenmeyer de 125 mL sont inoculés avec 500  $\mu\text{L}$  de la culture bactérienne et l'erlenmeyer est placé deux heures à 35°C, avec 250 rpm d'agitation. L'induction de la culture se fait avec 100  $\mu\text{L}$  d'une solution de 20% d'arabinose pour une concentration finale de 0,04%. La culture induite est incubée à nouveau pendant deux heures à 35°C avec agitation.

#### **3.4.2 Centrifugation**

L'erlenmeyer est déposé sur la glace avant que la culture soit centrifugée pendant 10 minutes à 8000 rpm et à 4°C dans une centrifugeuse Sorvall. Le culot obtenu est resuspendu dans 3 mL de tampon de sonication avec inhibiteurs: PMSF 1/100, 30  $\mu\text{L}$  de la solution concentrée et leupeptine 1/5000, 0,6  $\mu\text{L}$  de la solution concentrée.

#### **3.4.3 Les inhibiteurs**

L'inhibiteur de protéases PMSF ou phénylméthylsulfonyl fluoride est efficace pour inhiber les protéases à sérine (ex: chymotrypsine, trypsine et thrombine) et à cystéine (ex: papaine). Il est soluble dans l'isopropanol et la concentration recommandée est de 174  $\mu\text{g/mL}$  (1 mM). Il faut donc préparer une solution concentrée de 17,4 mg/mL (100 mM). Il est important d'ajouter l'inhibiteur à chaque étape de la purification (Sambrook, Fritsch et Maniatis, 1989, p.18.31; Grosch, 1998). L'inhibiteur de protéases leupeptine inhibe les protéases à sérine et à cystéine (ex: trypsine, papaine, plasmine et cathepsin B). Il est soluble dans l'eau et la concentration recommandée varie entre 0,5 et 2  $\mu\text{g/mL}$  (1 à 4  $\mu\text{M}$ ). Il faut donc préparer une

solution concentrée de 10 mg/mL (20 mM) (Sambrook, Fritsch et Maniatis, 1989, p.18.31; Grosch, 1998).

#### 3.4.4 Sonication des protéines

Le culot resuspendu avec inhibiteurs est congelé à -20°C pendant 30 minutes. Les culots sont décongelés sur glace avant de procéder à la destruction des membranes cellulaires à l'aide des ultrasons. Pour chaque tube, les ultrasons sont utilisés pour une période de 10 secondes répétée cinq fois. 0,5% de Triton X-100 (20 µL/4 mL) sont ajoutés et les tubes sont replacés à -20°C pendant 16 heures. Dès que le culot est décongelé, 20 mM d'imidazole (80 µL d'une solution de 1 M d'imidazole dans le tampon de sonication), 1 µL de leupeptine et 40 µL de PMSF sont ajoutés. La centrifugation de 30 secondes à 13 000 rpm est effectuée dans des tubes de 2 mL à l'aide d'une microcentrifugeuse de table.

#### 3.4.5 Purification des protéines

Le surnageant est transféré dans un tube de 15 mL contenant 300 µL d'un mélange de 50% de résine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose et de 50% de solution de sonication. Le mélange est incubé à 4°C pendant une heure avec agitation. La résine liée aux protéines est centrifugée une minute dans une centrifugeuse de table à vitesse maximale et lavée avec 10 mL d'une solution contenant: 30 mM imidazole, 0,5% de Triton X-100, PMSF et leupeptine dans du tampon de sonication. La résine, avec la solution de lavage, est placée 10 minutes sur glace, recentrifugée une minute à vitesse maximale et relavée une deuxième fois. Après centrifugation, le culot de résine est resuspendu dans 2 mL de tampon de sonication avec 30 mM imidazole. Ceci servira à remplir la colonne de purification. Cette dernière est formée d'une seringue de 3 mL (Syringe 3 cc Luer Lok®) dans laquelle un filtre découpé dans du papier filtre Whatman de type 1 est inséré. La résine chargée de protéines est déposée sur le filtre et recouverte d'un autre filtre pour éviter que la résine soit resuspendue lors du lavage. Le troisième lavage se fait avec 10 mL de tampon de sonication, 30 mM d'imidazole final. L'élution des protéines peut maintenant être effectuée en incubant la résine avec 333 µL de solution d'élution (tampon de sonication, 250 mM imidazole final) à la température de la pièce pendant 10 minutes avant de récupérer l'éluat. L'opération est répétée deux fois avec le même volume pour donner un total d'un millilitre de protéines diluées qui devront être dialysées pour éliminer les sels.

### 3.4.6 Dialyse des protéines

La dialyse se fait avec des membranes cylindriques Spectra/Por® munies des pores laissant passer les particules de moins de 12-14 000 kDa (MWCO 12-14 000). Les membranes sont placées dans l'eau bouillante pendant cinq minutes, rincées et remplies avec l'échantillon de protéines. Les échantillons sont dialysés contre un litre d'eau distillée avec 80 mM Tris-HCl pH 8,3 et 250 mM NaCl avec agitation magnétique pendant 16 heures à 4°C. Les protéines dialysées sont ensuite mises sur gel de polyacrylamide.

### 3.4.7 Gel de polyacrylamide

Pour un gel de séparation de 10% d'acrylamide, il faut mélanger 5 mL de solution 30% acrylamide/0,8% bisacrylamide avec 3,75 mL de tampon Tris/SDS pH 8,8 4X et 6,25 mL d'eau. Pour la polymérisation, 20 µL de TEMED (tétraméthyléthylènediamine) et 100 µL d'une solution fraîche de 10% de persulfate d'ammonium sont ajoutés à la solution d'acrylamide qui est immédiatement utilisée pour être coulée dans le moule. L'isobutanol 100% saturé d'eau est ajouté puis il y a polymérisation pendant 30 minutes. Le gel servant pour le dépôt des échantillons est de 5% d'acrylamide donc un mélange de 1,25 mL de la solution 30% acrylamide/0,8% bisacrylamide, 1,88 mL du tampon Tris-HCl/SDS pH 6,8 4X et 4,37 mL d'eau. 50 µL de la solution de 10% de persulfate d'ammonium et 10 µL de TEMED sont ajoutés juste avant de verser le mélange au dessus du gel de séparation. La polymérisation se poursuit pendant 30 minutes.

### 3.4.8 Préparation du marqueur et des échantillons

Pour utiliser un marqueur dans un gel de polyacrylamide, il faut 1 µL du marqueur "Broad Range Ladder", 15 µL d'eau, 4 µL de la solution pour échantillons 5X. Les échantillons et le marqueur sont placés dans l'eau bouillante pendant cinq minutes et les tubes sont centrifugés 10 secondes à vitesse maximale. De 10 à 20 µL du surnageant de chaque échantillon et 10 µL du surnageant du marqueur sont déposés dans les puits du gel de polyacrylamide. Le gel de polyacrylamide est soumis à un courant de 200 volts pendant 30 à 60 minutes. Le temps de migration dépend de la taille des bandes ciblées et de la concentration du gel en acrylamide. La

coloration du gel se fait dans une solution de coloration avec le colorant bleu "Brilliant Blue R-250" dissout dans une solution fixatrice pendant 30 minutes. La décoloration se fait avec la solution de décoloration et peut prendre d'une à trois heures.

#### 4. Clivage avec la protéase TEV

Les protéines dialysées doivent ensuite être clivées avec la protéase recombinante du virus TEV pour pouvoir éliminer la thioredoxine dans la région aminée de la protéine. Pour procéder au clivage, il faut 60  $\mu\text{L}$  de protéines dialysées pour un total d'environ 3  $\mu\text{g}$  de protéines qui seront clivées avec 0,3  $\mu\text{L}$  de rTEV (trois unités: une unité de rTEV coupe 3  $\mu\text{g}$  en une heure à 30°C) dans le tampon de réaction "20X reaction buffer". La concentration finale en DDT est de 0,5 mM. La réaction est incubée de trois à quatre heures à la température de la pièce et vérifiée à nouveau sur gel de polyacrylamide. La fusion à la thioredoxine augmentait la masse moléculaire de la protéine purifiée de 11,7 kDa. Il faut donc vérifier si la thioredoxine a été clivée et si la protéine a maintenant une masse moléculaire plus faible.

#### 5. Inhibition de l'activité PLA<sub>2</sub>

##### 5.1 Inhibition avec la manoalide

Des cellules PT sontensemencées dans une plaque de 96 puits.

Les solutions utilisées sont les suivantes:

- A) Tampon de contrôle pour les capsides purifiées: dans 100 ml, 0,1 M Tris à pH 8 et 290 mg de CaCl<sub>2</sub> (20 mM final)
- B) Tampon de contrôle pour les capsides non-purifiées: Dans 100 mL de DMEM, 290 mg de CaCl<sub>2</sub> (20 mM final)
- C) Tampon manoalide pour capsides purifiées: Dans 10 mL d'eau: 0,1 M de Tris à pH 8, 29 mg de CaCl<sub>2</sub> (20 mM final) et 10  $\mu\text{L}$  de la solution de manoalide à 0,02 M (20  $\mu\text{M}$  final).
- D) Tampon manoalide pour capsides non-purifiées: dans 10 mL DMEM, 29 mg de CaCl<sub>2</sub> (20 mM final) et 10  $\mu\text{L}$  de la solution de manoalide à 0,02 M (20  $\mu\text{M}$  final).

Pour tester l'inhibition par l'inhibiteur manoalide de capsides avec PLA<sub>2</sub> à la surface, il faut d'abord pré-incuber les capsides avec les tampons de contrôle ou contenant la manoalide pendant une heure à 40°C. Les molécules de manoalide restantes sont enlevées grâce à un tube

centricon-100 (Millipore). Les capsides sont rincées avec le tampon de contrôle approprié et resuspendues dans du DMEM. La solution est stérilisée grâce à un filtre 0,2  $\mu\text{m}$  et diluée pour avoir des concentrations allant de 5  $\mu\text{M}$  à 40  $\mu\text{M}$  (5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  et 40  $\mu\text{M}$ ) dans du DMEM. Les cellules sont incubées avec les différentes solutions et différentes dilutions pendant une heure avant que le surnageant soit retiré pour être remplacé par du DMEM. Les cellules sont vérifiées après 24 heures pour calculer le nombre de cellules vivantes par puits.

## 5.2 Inhibition avec l'oleyloxyéthyl phosphorylcholine (OP)

Des cellules PT sontensemencées dans une plaque de 96 puits.

Les solutions utilisées sont les suivantes:

- A) Tampon de contrôle: DMEM
- B) Tampon avec OP: DMEM avec 20  $\mu\text{M}$  de OP (dilution 1:100 à partir de la solution 20 mM)

Pour tester l'inhibition avec OP, le tampon de contrôle ou OP est ajouté aux puits contenant les cellules. Des dilutions allant de 5  $\mu\text{M}$  à 40  $\mu\text{M}$  (5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  et 40  $\mu\text{M}$ ) sont utilisées et le tout est incubé une heure. Les capsides sont rincées avec le tampon approprié en conservant toujours la concentration en OP stable. Après 24 heures, la mort cellulaire est évaluée et le tampon est changé encore une fois en gardant la concentration en OP stable.

## 6. Essai avec *E. coli*

### 6.1 Caractéristiques générales de l'essai

Pour tester l'activité phospholipase, la bactérie *E. coli* autoclavée dont les carbones des chaînes d'acides gras sont marqués, représente un substrat de phospholipides mixtes très économique et avantageux dont les résultats sont facilement reproductibles (Elsbach *et al.*, 1979). Cette méthode permet de détecter la présence de faibles quantités d'enzymes PLA<sub>2</sub> dans un échantillon (Reynolds, Hughes et Dennis, 1992). Les trois phospholipides les plus importants de *E. coli* sont le phosphatidyléthanolamine, le phosphatidylglycérol et le cardiolipine. Chez les bactéries *E. coli* marquées radioactivement, grâce à un marquage de la membrane, plus de 95% de la radioactivité des lipides est associée aux phospholipides. Le plus marqué est le phosphatidyléthanolamine (60%) suivit du phosphatidylglycérol (19%) ce qui représente bien la



distribution des phospholipides dans la membrane de *E. coli*. Peu de radioactivité est associée au lysophosphatidyléthanolamine et aucune n'est associée au lysophosphatidylglycérol.

L'acide oléique marqué ( $^{14}\text{C}$ ) est utilisé car il est incorporé presque exclusivement au niveau du  $\text{C}_2$  des phospholipides. Étant donné que la  $\text{PLA}_2$  a pour fonction de cliver au niveau de ce deuxième carbone, la radioactivité retrouvée dans le surnageant proviendra donc des acides gras libérés par cette réaction enzymatique, prouvant ainsi la présence d'une activité  $\text{PLA}_2$  (Patriarca, Beckerdite et Elsbach, 1972). L'autoclavage détruit les phospholipases bactériennes et permet aux phospholipides de l'enveloppe d'être facilement accessibles par les phospholipases ajoutées (Elsbach *et al.*, 1979).

### 6.2 Préparation des bactéries radioactives

Cette méthode sert à vérifier et quantifier l'activité phospholipase  $\text{A}_2$  des protéines VPI mutées ou sauvages. 25  $\mu\text{Ci}$  d'acide oléique (50  $\text{mCi}/\text{mmol}$ ) sont ajoutés à 50 mL de milieu LB avec 200  $\mu\text{L}$  d'une culture bactérienne préalablement incubée 16 heures à  $37^\circ\text{C}$  avec agitation. La culture de 50 mL avec radioactivité est incubée à  $37^\circ\text{C}$  avec agitation jusqu'à l'obtention d'une densité optique de 0,5 à 600 nm. Le volume total est centrifugé dans un tube à centrifugation de 250 mL à l'aide d'une centrifugeuse Sorvall pendant 15 minutes à  $4000 \times g$ . Le surnageant est rejeté et le culot est resuspendu dans 50 mL de milieu LB puis la culture est remis dans l'incubateur à  $37^\circ\text{C}$  avec agitation pendant 30 minutes pour permettre aux bactéries d'incorporer l'acide oléique radioactif au niveau du deuxième carbone de leurs phospholipides. La culture est ensuite lavée deux fois avec 25 mL de milieu LB et deux fois avec 7 mL d'une solution à concentration saline physiologique (0,9% NaCl) dans des tubes de 15 mL. Le culot final est resuspendu dans 1,5 mL de la solution 0,9% NaCl dans un tube de 2 mL qui est ensuite déposé dans une marmite à pression dont la température atteindra  $120^\circ\text{C}$  avec une pression de  $2,7 \text{ kg}/\text{cm}^2$  pendant 15 minutes. Les bactéries sont centrifugées à 13 000 rpm pendant 3 minutes et lavées deux fois avec une solution de 0,9% NaCl. 10 000 cpm sont nécessaires par réaction et cette quantité est évaluée à l'aide d'un compteur à scintillations.

### 6.3 Réaction enzymatique et analyse de l'activité $\text{PLA}_2$

La réaction est donc constituée de 10 000 cpm de bactéries diluées avec 100  $\mu\text{L}$  d'une solution 50 mM Tris à pH 8 et 1 mM  $\text{CaCl}_2$ . Différentes dilutions d'enzymes ou de protéines sont

ajoutées à la réaction pour évaluer l'activité enzymatique. La réaction dure 30 minutes et les bactéries sont éliminées en centrifugant à 20 000 x g pendant 2 minutes dans une microcentrifugeuse. La moitié du surnageant (environ 50  $\mu$ L) est utilisée pour évaluer la radioactivité et ainsi déterminer l'activité enzymatique. Les 50  $\mu$ L sont ajoutés à 5 mL de liquide à scintillations et les échantillons sont analysés grâce à un compteur de scintillations (Patriarca, Beckerdite et Elsbach, 1972).

### **7. Mesure de l'activité PLA<sub>2</sub> avec les micelles mixtes**

Tout comme la méthode précédente, ce protocole sert à détecter et mesurer l'activité PLA<sub>2</sub> des protéines purifiées obtenues. Cette méthode utilise le L-3-phosphatidylcholine, 1,2-di[1-<sup>14</sup>C]oleoyl (110 mCi/mmol) dans une solution de toluène:éthanol (1:1). 1,3  $\mu$ L du produit est séché et dissous dans 45  $\mu$ L d'une solution de 50 mM de Tris à pH 8, 1 mM de CaCl<sub>2</sub> et 1 mM de Triton X-100, puis la solution est incubée pendant 15 minutes à 37°C. Le Triton sert à la formation de micelles. Les enzymes ou les protéines sont diluées dans une solution 50 mM Tris à pH 8 et 1 mM CaCl<sub>2</sub> avant d'être ajoutées à la réaction. Le mélange des protéines avec les micelles mixtes est incubé 10 minutes à 37°C puis la réaction est arrêtée avec 80  $\mu$ L d'une solution 2:1 chloroforme:méthanol et 50  $\mu$ L d'une solution saturée en chlorure de potassium (KCl) 4 M. La réaction est mélangée au vortex, centrifugée trois minutes à 13 000 rpm puis toute la phase organique (phase inférieure, environ 45  $\mu$ L) est déposée sur une membrane pour TLC (Thin Layer Chromatography ou chromatographie sur couche mince) à coup de 5  $\mu$ L sur le même point à 2 cm de l'extrémité inférieure de la membrane pour TLC. Le réservoir pour TLC est équilibré pendant 2 heures avec une solution pour la migration composée d'un mélange de chloroforme:méthanol:eau selon le rapport 65:35:4. La membrane est déposée dans le réservoir, l'extrémité inférieure reposant dans la solution. La migration se termine après 2 heures ou lorsque le liquide a atteint la limite supérieure de la membrane puis la membrane est séchée à l'air. L'appareil PhosphorImager™ SI de Molecular Dynamics est utilisé pour développer la membrane qui est ensuite quantifiée et analysée à l'aide du logiciel ImageQuant® de Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA.

## 8. Transfection de cellules PT avec les clones infectieux

### 8.1 Préparation des cellules

Le protocole "Effectene Transfection Reagent Handbook" de Qiagen sert pour transfecter des cellules adhérentes à une surface dans des Pétri de 60 mm de diamètres. La veille de la transfection, il faut déposer de  $2 \times 10^5$  à  $8 \times 10^5$  cellules par Pétri dans 5 mL du milieu de croissance avec sérum et antibiotiques. Ces cellules sont incubées à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub> pendant 16 heures. Avant la transfection, les cellules devraient être entre 40% et 80% de confluence.

### 8.2 Transfection

1 µg de l'ADN à transfecter est dissout dans du TE à pH 7,4 pour une concentration minimale de 0,1 µg/µL puis dilué dans le tampon de condensation de l'ADN "Buffer EC" pour un total de 150 µL. 8 µL de la solution "Enhancer" sont ajoutés à la solution d'ADN et le tout est mélangé au vortex pendant une seconde. La solution est ensuite incubée à la température de la pièce pendant 5 minutes et centrifugée quelques secondes pour rassembler tout le volume au fond du tube. 25 µL du réactif "Effectene Transfection Reagent" sont ajoutés, la solution est mélangée en vortexant pendant 10 secondes puis incubée pendant 10 secondes à la température de la pièce. Pendant ce temps, les cellules sont préparées pour la transfection: le milieu de croissance est enlevé pour permettre de rincer les cellules avec une solution de PBS et ensuite remettre 4 mL de milieu de croissance frais. 1 mL de milieu de croissance est ajoutée au mélange d'ADN et après l'avoir bien mélangé, ce mélange est ajouté aux cellules. L'incubation des cellules a lieu dans un incubateur à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>. Les virus obtenus par transfection sont utilisés pour infecter des cellules PT et l'infection et la production de nouvelles particules infectieuses sont vérifiées par immunofluorescence.

## 9. Immunofluorescence

Les cellules transfectées ou infectées sont fixées dans leur Pétri en plastique en utilisant du tampon pour immunofluorescence avec 3% de formaldéhyde pendant 20 à 30 minutes à la température de la pièce (25°C). Ensuite, les cellules sont incubées 20 à 30 minutes à 25°C avec 3% de Triton X-100 dans du tampon pour immunofluorescence. Les cellules sont lavées une fois avec une solution saline (PBS) avant d'être incubées avec le premier anticorps pendant une heure

à 25°C. Ce premier anticorps, l'anticorps monoclonal 3C9 est spécifique pour la région carboxylée de la partie unique de la protéine VP1 du PPV. Après un autre lavage avec du PBS, les cellules sont maintenant incubées une heure avec le deuxième anticorps à 25°C. C'est un anticorps anti IgG de souris marqué avec un fluorochrome FITC qui sert de deuxième anticorps permettant de détecter la présence de l'anticorps 3C9 fixé aux cellules infectées. Les cellules sont lavées deux fois avec du PBS avant d'être examinées à l'aide d'un microscope à fluorescence (Li *et al.*, 1996).

## **10. Amorces**

### **10.1 Liste des amorces**

Le tableau III décrit les amorces utilisées lors du séquençage du plasmide pBAD/Thio, les amorces utilisé lors du séquençage des clones contenant différentes régions du génome du PPV et les amorces utilisées lors de réactions de PCR. Les amorces pour le séquençage du plasmide pBAD/Thio proviennent d'Invitrogen et les autres amorces ont été synthétisées au service de synthèse d'oligonucléotides de l'INRS-Institut-Armand-Frappier, Laval, Québec.

### **10.2 Positions des différentes mutations et résultats**

Le tableau IV indique la position dans le génome du PPV des différentes mutations, leur position dans la séquence en acides aminés du PPV et de la PLA<sub>2</sub> et le résultat de la mutation, c'est-à-dire quel est le nouvel acide aminé dans la séquence mutée.

### **10.3 Descriptions des mutations effectuées et résultats obtenus**

Le tableau V décrit les mutations effectués dans la séquence de la partie unique de la VP1 de PPV. Ce tableau comprend la séquence de l'amorce avec le ou les nucléotides mutés en caractères gras ainsi que le codon sauvage et le codon muté et leurs acides aminés respectifs.

**Tableau III** Amorces pour le système pBAD/Thio-TOPO, pour le séquençage et pour les réactions de PCR.

Noms	Séquences	Positions/Rôles
Trx Forward Sequencing Primer	5'-TTC CTC GAC GCT AAC CTG-3'	amorces pour le séquençage avec le vecteur pBAD
pBAD Reverse Sequencing Primer	5'-GAT TTA ATC TGT ATC AGG-3'	
PPVP15	5'-GCC TCG AGA TGG CGC CTC CTG CAA AAA G-3'	codon d'initiation de la VP1 (2279-2306), ajoute un site de restriction <i>Xho</i> I (CTC GAG)
PPV-PR60 reverse	5'-TGT CTA GTG CGA CCA TTA AG-3'	située juste après le site <i>Hind</i> III (3344-3325)
PPV-PR61 forward	5'-TAC ATA TAA AAC TAA CTG C-3'	située dans l'intron au niveau de VP1/NS3 (2345-2363)
PPV-PR62 reverse	5'-CAA ATA GTT GTC CTG GTG-3'	située après le deuxième site <i>Bgl</i> II (4295-4278)
FPOVP133	5'-GCC TCG AGG AGT TCA TTT CCT GTT GCA GAC-3'	PCR pour sous-clonage des ADN mutés de pT7-VP1 à pBAD
FPOVP15	5'-GCG GAT CCG CGC CTC CTG CAA AAA GAG CAA GAG GAC-3'	
POLIL5	5'-AGA TCT GAA TTC GAA CTC GAG CTC TCT AGA A-3'	Ajout d'un site de clonage multiple au vecteur pBAD
POLIL3	5'-TCT AGA GAG CTC GAG TTC GAA TTC AGA TCT A-3'	
T7MU5	5'-GAA ATG AGC TGT TGA CTA ATA CGA CTC ACT ATA CTG TGG AAT TGT GAG C-3'	Modification du promoteur du vecteur pPROEX HTb
T7MU3	5'-G CTC ACA ATT CCA CAG TAT AGT GAG TCG TAT TAG TCA ACA GCT CAT TTC-3'	
TEV5	5'-GAT CCG AAA ACC TGT ATT TTC AGG GCA-3'	Ajout d'un site de clivage pour rTEV dans le vecteur pBAD
TEV3	5'-GAT CTG CCC TGA AAA TAC AGG TTT TCG-3'	

**Tableau IV** Positions des différentes mutations et les résultats obtenus.

Mutations	Positions dans la séquence du PPV	Positions PPV	Positions PLA <sub>2</sub>	Résultats
P31L	2420-2422 (CCA)	21	31	Proline par Leucine
P31R	2420-2422 (CCA)	21	31	Proline par Arginine
P31W	2420-2422 (CCA)	21	31	Proline par Tryptophane
D42E	2462-2464 (GAC)	35	42	Acide aspartique par acide glutamique
D42N	2462-2464 (GAC)	35	42	Acide aspartique par asparagine
H48A	2480-2482 (CAC)	41	48	Histidine par alanine
D49N	2483-2485 (GAC)	42	49	Acide aspartique par asparagine
HD48AN	2480-2485 (CAC-GAC)	41-42	48-49	Histidine et acide aspartique par alanine et asparagine
D99A	2546-2548 (GAT)	63	99	Acide aspartique par alanine
D99N	2546-2548 (GAT)	63	99	Acide aspartique par asparagine



**Tableaux V** Amorces, description des mutations effectuées et résultats obtenus.

Mutations	Résultats
P31L	5'-C AAA TAC CTT GGT CTA GGA AAC TCA CTA G-3' La proline (CCA) est mutée pour une leucine (CTA).
P31R	5'-C AAA TAC CTT GGT CGA GGA AAC TCA CTA G-3' La proline (CCA) est mutée pour une arginine (CGA).
P31W	5'-C AAA TAC CTT GGT TGG GGA AAC TCA CTA G-3' La proline (CCA) est mutée pour un tryptophane (TGG).
H48A	5'-CC GCA GCA AAA GAA GCC GAC GAA GCC TAC GAC-3' L'histidine (CAC) est mutée pour une alanine (GCC).
D49N	5'-CC GCA GCA AAA GAA CAC AAC GAA GCC TAC GAC-3' L'acide aspartique (GAC) est muté pour une asparagine (AAC).
HD48AN	5'-CC GCA GCA AAA GAA GCC AAC GAA GCC TAC GAC-3' L'histidine et l'acide aspartique (CAC GAC) sont mutés pour une alanine suivit d'une asparagine (GCC AAC).
D42E	5'-CT AAT CCA TCA GAA <u>GCT GCA GCA</u> AAA GAA CAC G-3' L'acide aspartique (GAC) est muté pour un acide glutamique (GAA). L'alanine suivante subit une mutation silencieuse de son codon GCC pour un codon GCT, pour créer un site de restriction pour l'enzyme <i>Pst</i> I ( <u>CTG CAG</u> ).
D42N	5'-CT AAT CCA TCA AAC <u>GCA GCT GCA</u> AAA GAA CAC G-3' L'acide aspartique (GAC) est muté pour une asparagine (AAC). Les deux alanines suivantes subissent des mutations silencieuses: leurs codons initiaux (GCC GCA) deviennent GCA GCT pour permettre la création d'un site de restriction de l'enzyme <i>Pvu</i> II ( <u>CAG CTG</u> ).
D99A	5'-C TAC TTC TCA <u>GCA GCG GCT</u> GAA AAA TTC ATA AAA G-3' L'acide aspartique (GAT) est muté pour une alanine (GCT). L'alanine précédante subit une mutation silencieuse de son codon GCT pour un codon GCG pour éliminer le site de restriction de l'enzyme <i>Pvu</i> II (le site de restriction CAG CTG devient <u>CAG CGG</u> ).
D99N	5'-C TTC TCA <u>GCA GCT AAT</u> GAA AAA TTC ATA AAA G-3' L'acide aspartique (GAT) est muté pour une asparagine (AAT). Cette mutation élimine le site de restriction de l'enzyme <i>Pvu</i> II (le site de restriction CAG CTG devient <u>CAG CTA</u> ).

## 11. Solutions

### 11.1 Inhibiteurs

Pour utiliser le manoalide, il faut dissoudre 1 mg dans 240  $\mu\text{L}$  d'éthanol pour obtenir une solution de 0,010 M (10 mM). La concentration finale utilisée pour évaluer l'inhibition enzymatique par le manoalide est de 10  $\mu\text{M}$  (dilution 1/1000) à 0,02  $\mu\text{M}$  (1/500 000).

Pour utiliser l'oleyloxyéthyl phosphorylcholine, il faut dissoudre 10 mg dans 1 mL d'éthanol pour obtenir une concentration finale de 0,020 M (20 mM). La concentration de travail est de 20  $\mu\text{M}$  (dilution 1/1000) à 1  $\mu\text{M}$  (dilution 1/20 000).

### 11.2 Milieux de culture

Pour un litre de milieu LB, il faut dissoudre 10 g de tryptone, 5 g d'extrait de levures et 10 g de chlorure de sodium. Le pH est ajusté à 7 avec environ 1 mL de NaOH.

Pour le milieu LB-Agar utilisé pour les géloses, 15 g de Bacto agar sont ajoutés à un litre de milieu LB. Après stérilisation à l'autoclave, 10 mL de milieu LB-agar sont versés dans chaque Pétri. Si les géloses doivent servir pour la sélection de clones positifs grâce à des antibiotiques, le milieu doit être refroidi à 50°C après autoclavage avant que les antibiotiques soit ajoutés. L'ampicilline est utilisée à une concentration de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Le milieu SOC est composé de 2% tryptone, de 0,5% extrait de levures, de 10 mM NaCl, de 2,5 mM KCl, de 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , de 10 mM  $\text{MgSO}_4$  et de 20 mM glucose.

Pour un litre de milieu NZY+broth il faut dissoudre 10 g de NZ amine (casein hydrolysate), 5 g d'extrait de levures et 5 g de NaCl dans 965 mL d'eau, autoclaver et ajouter 12,5 mL de  $\text{MgSO}_4$  1 M, 12,5 mL de  $\text{MgCl}_2$  1 M et 10 mL d'une solution de glucose 2 M filtrée.

### 11.3 Solutions pour gel d'agarose

Pour obtenir une solution de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de bromure d'éthide, il faut dissoudre 0,2 g de bromure d'éthide dans 20 mL d'eau pour avoir une solution de réserve de 10 mg/mL. 400  $\mu\text{L}$  de

cette solution est diluée dans 400 mL d'eau pour donner un bain de bromure d'éthide dans lequel les gels sont colorés.

Le tampon TAE 50X contient 242 g de Tris base, 57,1 mL d'acide acétique glacial et 37,2 g de  $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  dissous dans de l'eau distillée pour un total d'un litre de solution. Le pH de la solution doit être ajusté à 8,5 et la solution est diluée pour obtenir une solution 1X.

Le tampon de chargement III, 6X pour échantillons d'ADN est composé de 0,25% de bleu de bromophénol (p/v), 0,25% de xylène cyanol FF (p/v) et 30% de glycérol (v/v). Il faut dissoudre 0,25 g de bleu de bromophénol et 0,25 g de xylène cyanol FF dans 50 mL d'eau auxquels il faut ajouter 30 mL de glycérol et compléter le volume à 100 mL avec de l'eau.

#### 11.4 Solutions pour les gels de polyacrylamide

La solution de 30% acrylamide/0,8% bisacrylamide est obtenue en mélangeant 30 g d'acrylamide avec 0,8 g de N,N'-méthylène-bisacrylamide dans 100 mL d'eau et en filtrant la solution avec un filtre de 0,45  $\mu\text{m}$ . La solution se conserve à 4°C dans l'obscurité.

La solution Tris-Cl/SDS, pH 8,8 4X (1,5 M Tris-Cl et 0,4% SDS) est obtenue de la façon suivante: 91 g de Tris base et 2 g de SDS sont dissous dans 300 mL d'eau, le pH est ajusté à 8,8 avec du HCl 1 N et le volume est ajusté à 500 mL avec de l'eau.

La solution Tris-Cl/SDS, pH 6,8 4X (0,5 M Tris-Cl et 0,4% SDS) est obtenue de la façon suivante: 6,05 g de Tris base et 0,4 g de SDS sont dissous dans 40 mL d'eau et le pH est ajusté à 6,8 avec du HCl 1 N avant de compléter le volume à 100 mL avec de l'eau.

Le tampon SDS d'électrophorèse 5X est obtenu lorsque 15,1 g de Tris base, 72 g de glycine et 5 g de SDS sont dissous dans un litre d'eau. Le pH s'ajustera à 8,3 lorsque la solution sera diluée à 1X.

Le tampon SDS d'échantillon 6X est obtenu en mélangeant 4,56 g de Tris base, 60 mL de glycérol, 6 g de SDS et 3 mg de bleu de Bromphénol dans de l'eau. Le pH doit être ajusté à 6,8 avec du HCl 1 N et le volume est ajusté à 100 mL avec de l'eau.

Pour obtenir la solution de coloration avec colorant bleu "Brilliant Blue R-250" dans une solution fixatrice il faut 0,05% bleu R-250 dans un mélange de 50% méthanol, 10% acide acétique glacial et 40% d'eau. Pour un litre de solution, il faut donc dissoudre 0,5 g de bleu R-250 dans 500 mL de méthanol et ensuite ajouter 100 mL d'acide acétique glacial et 400 mL d'eau.

### **11.5 Solutions pour minipréparation d'ADN**

La solution de resuspension (solution I) est composée de 50 mM glucose, 25 mM Tris-Cl (pH 8) et de 10 mM EDTA (pH 8)

La solution de lyse (solution II) est composée de 1% SDS et 0,2 N NaOH. Pour 100 mL de solution, il faut 10 mL de SDS 10%, 10 mL de NaOH 2 N et 80 mL d'eau.

La solution de neutralisation (solution III) est composée de 3 M acétate de potassium à pH 5,5. Pour 100 mL de solution, il faut 60 mL d'acétate de potassium 5 M, 11,5 mL d'acide acétique glacial et 28,5 mL d'eau. La concentration finale en potassium est de 3 M et de 5 M en acétate.

## **12. Matériel**

### **12.1 Anticorps**

-Anticorps anti IgG(H+L) souris, fluorochrome FITC: Isothiocyanate de fluoresceine, Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes-la-Coquette, France, #74641

### **12.2 Appareils et accessoires**

- Compteur de scintillations "Tri-Carb® Liquid Scintillation Analyser", Canberra Packard Canada Ltd, Montréal, QC, #2200CA
- Électroporateur (BTX ECM®395 Electroporation System, BTX, San Diego, CA, USA)
- Membranes cylindriques Spectra/Por®, Molecularporous membrane tubing, The Spectrum Companies, Gardena, CA, USA, #132 676
- Plaques pour TLC, 250 µm d'épaisseur, gel de silice sur fond d'aluminium, Whatman® AL SIL G/UV, Whatman Ltd, Maidstone, Kent, England, #4420 222
- Séquenceur du service de séquençage de l'INRS-Institut-Armand-Frappier: ABI PRISM™ 310 (Applied Biosystems) Genetic Analyser, Perkin Elmer Corporation, Foster City, CA, USA, #903565

-Système pour gel de polyacrylamide: Mini-PROTEAN II Cell, BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA, #165-2940

-Thermocycleur TOUCHDOWN™ Temperature Cycling System, Hybaid Limited, Teddington, UK, #HB-TD-CM05A

### 12.3 Cellules

-Cellules électrocompétentes Epicurian Coli® Sure®, Stratagene, La Jolla, CA, USA, #200227, résistantes à la kanamycine et à la tétracycline

-LMG194 pour l'expression de protéine avec le système pBAD/Thio-TOPO possède une délétion pour *araBAD*C et est résistante à la streptomycine et à la tétracycline, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, #K370-01

-TOP10 One-Shot™ Competent Cells, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, #K370-01

### 12.4 Divers

-Qiagen Miniprep, Qiagen plasmid mini kit, Qiagen Inc. Mississauga, ON, Canada, #12125

-Résine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose, nickel-charged resin (maximum pressure: 2,8 psi), Qiagen Inc., Mississauga, ON, Canada, #30210

### 12.5 Enzymes

-Ligase d'ADN T4, Gibco BRL® Life Technologies™, Grand Island, NY, USA, #15224-017

-Phospholipase A<sub>2</sub> du venin d'abeille à miel *Apis mellifera* (famille *Apidae*, sous-famille *Apinae*), Sigma Chemical Co., St-Louis, MO, USA, #V 3250

-Polymérase d'ADN native *Pfu*, 2,5 U/μL, isolée de *Pyrococcus furiosus*, Stratagene, La Jolla, CA, USA, #600136

-Protéase recombinante TEV (Tobacco Etch Virus, rTEV), Gibco BRL® Life Technologies™, Grand Island, NY, USA, #10127-017

-Ribonucléase I A (RNase A) de pancréas bovin, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA, #27-0323

-*Taq* DNA Polymerase, 5 U/μL, Gibco BRL® Life Technologies™, Grand Island, NY, USA, #18038-018

### 12.6 Inhibiteurs

-Leupeptine, Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada, #1 017 101

- Manoalide, Biomol® Research Laboratories, Inc., Plymouth Meeting, PA, USA, #EI-177
- Oleyloxyéthyl phosphorylcholine, Biomol® Research Laboratories, Inc., Plymouth Meeting, PA, USA, #EI-118
- Phénylméthylsulfonyle fluoride, PMSF, Gibco BRL Ultra Pure, Grand Island, NY, USA, #15521-016

### 12.7 Marqueurs

- Marqueur 1 kb, Gibco BRL® Life Technologies™, Grand Island, NY, USA, #15615-016
- Marqueur 100 pb, Gibco BRL® Life Technologies™, Grand Island, NY, USA, #15628-019
- Marqueur de masses moléculaires, SDS-PAGE Standards, broad range, BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA, #161-0317

### 12.8 Produits

- Acide [1-<sup>14</sup>C]oléïque, 1,85 GBq/mmol, 50 mCi/mmol, 3,7 MBq/mL, 100 µCi/mL, dans une solution de toluène, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA, #CFA243-50 µCi
- Arabinose, L (+) Arabinose, Sigma Chemical Co., St-Louis, MO, USA, #A-3256
- Colorant bleu "Brilliant Blue R-250", Sigma Chemical Co., St-Louis, MO, USA, #B-7920
- Liquide à scintillation "EcoLite™(+) Environmentally Safe Liquid Scintillation Cocktail" ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA, USA, #882475
- L-3-phosphatidylcholine, 1,2-di[1-<sup>14</sup>C]oleoyl, dans une solution 1:1 toluène:éthanol, 4,07 GBq/mmol, 110 mCi/mmol, 925 kBq/mmol, 25 µCi/mL, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA, #CFA695 B24

### 12.9 Vecteurs

- pBAD, vecteur linéarisé pour le système pBAD/Thio-TOPO, 10 ηg/µL, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, #K370-01
- pPROEX HTb pour le système d'expression procaryotique pPROEX™HT, Gibco BRL® Life Technologies™, Grand Island, NY, USA, #10711-018
- pUC19, New England Biolabs Inc., Beverly, MA, USA, #304-1S

## **RÉSULTATS**



## 1. Réaction de PCR sur les clones mutés

Une réaction de PCR a été effectuée sur tous les clones mutants ou sauvages dans le plasmide pT7 pour permettre le transfert dans le nouveau plasmide pour l'expression des protéines, le vecteur pBAD/Thio modifié (Matériel et méthodes, section 3.3). Le fragment d'ADN obtenu après migration des produits de PCR sur gel d'agarose montre des bandes à 500 pb pour cinq des six mutants vérifiés (figure 8). Ce fragment correspond à la partie unique de la protéine VP1 du PPV. Ces fragments ont ensuite été transférés dans le vecteur pBAD/Thio modifié pour effectuer l'expression des protéines.

## 2. Expression de la partie unique de VP1

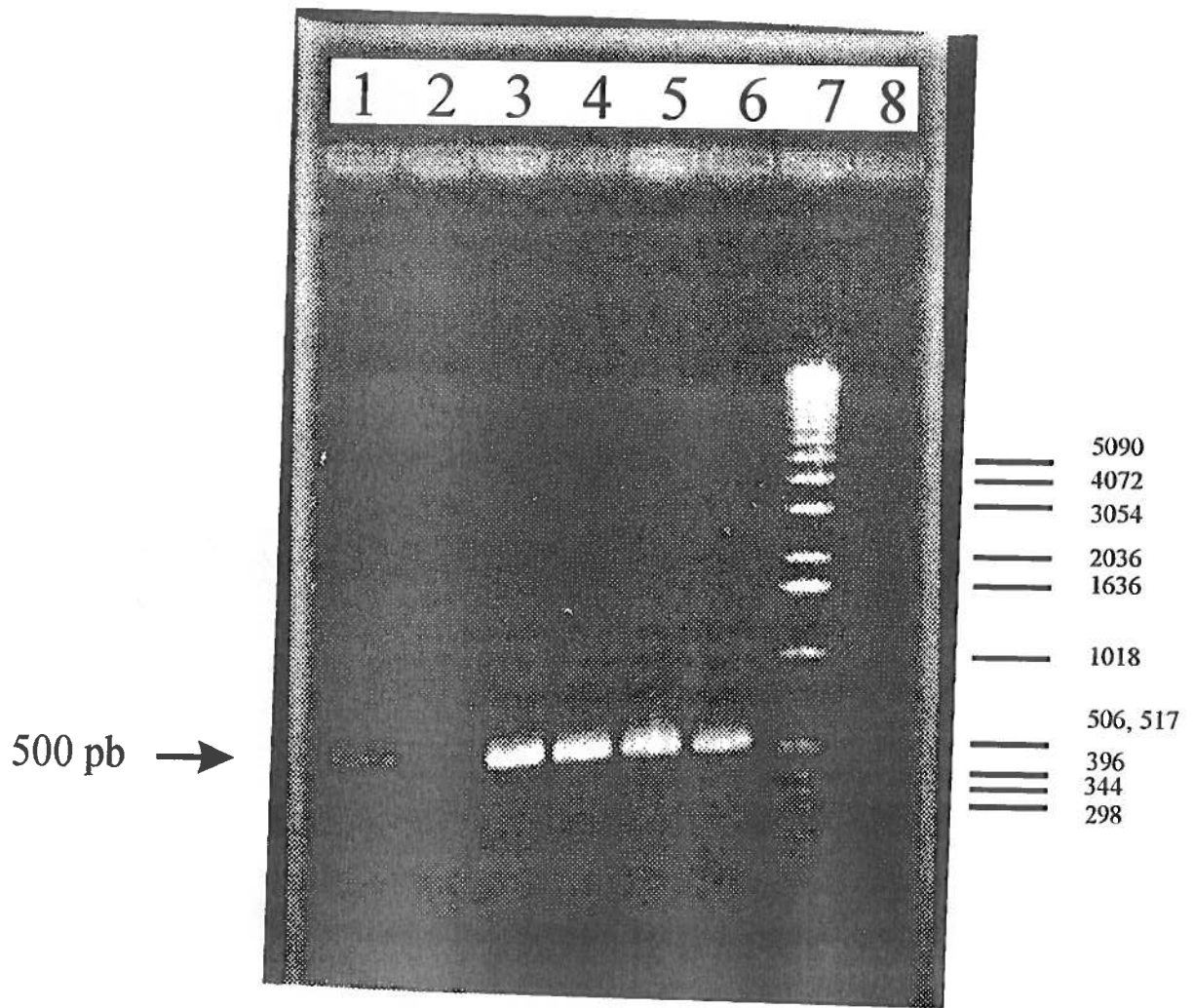
Le gel de polyacrylamide de la figure 9 permet de démontrer l'expression dans *E. coli* de la partie unique de la VP1 de PPV, de type sauvage ou mutée, et celles de *GmDNV* et de B19. Les cinq mutations représentées sur ce gel sont HD48AN, H48A, D99A, D49A et D42N. En comparant avec l'échelle de masses moléculaires, la masse moléculaire des protéines VP1 provenant du PPV peut être évaluée à 40 kDa. La masse moléculaire de la VP1 de *GmDNV* est de 55 kDa et celle du B19, 50 kDa. Le second gel identifie la présence de la protéine purifiée avec la mutation P31W et le troisième démontre l'expression des quatre derniers mutants, D42E, D99N, P31L et P31R en plus de reconfirmer l'expression des mutants HD48AN et H48A (figure 10).

## 3. Tests d'activité PLA<sub>2</sub> des capsides de B19 et de PPV

### 3.1 Concentration en calcium

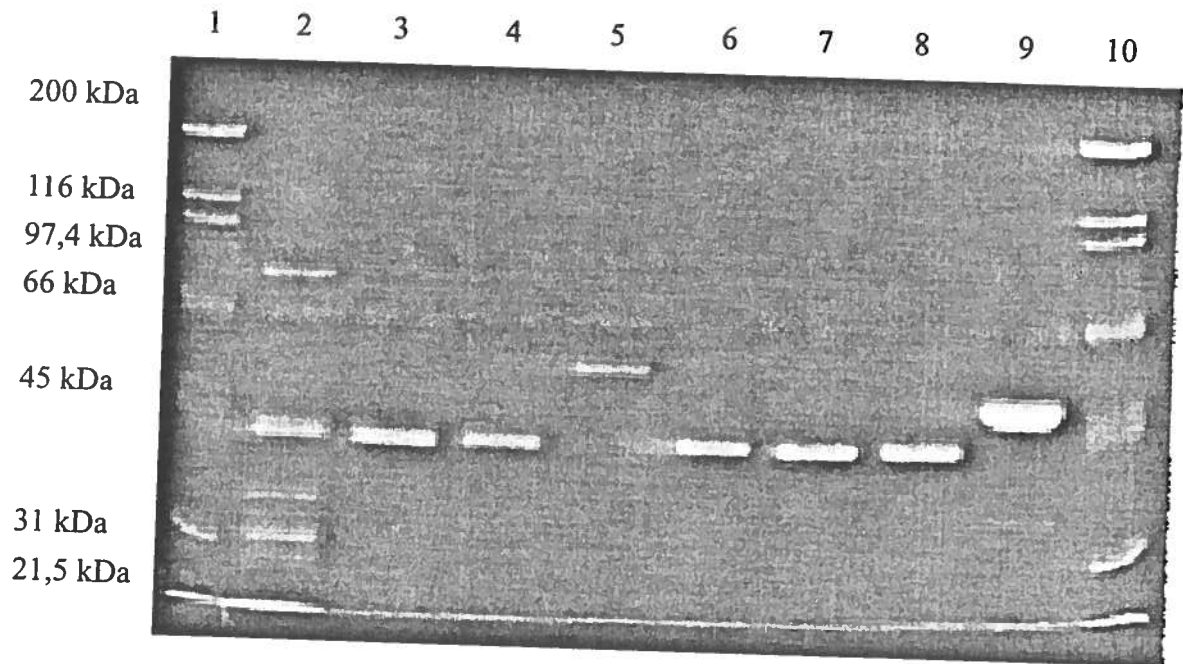
Différentes expériences ont été effectuées dans le but de mesurer l'activité PLA<sub>2</sub> des capsides de deux parvovirus, le B19 et le PPV, selon différentes conditions (tableau VI). Ces capsides ont été exprimées grâce à deux baculovirus recombinants. Ce travail a été effectué par Zoltan Zadori dans le laboratoire de Peter Tijssen. Dans un premier temps, l'effet de la concentration en ion calcium a été mesuré. Trois différentes concentrations et les résultats sont exprimés en pourcentage, 100% indiquant l'activité maximale. C'est à une concentration de 10 mM que l'activité est maximale pour les deux virus. Lorsque le calcium est remplacé par l'EDTA

**Figure 8** Résultats du PCR effectué avec les amorces FPOVP15 et FPOVP133 sur les clones mutant et le clone sauvage dans le plasmide pT7-VP1.



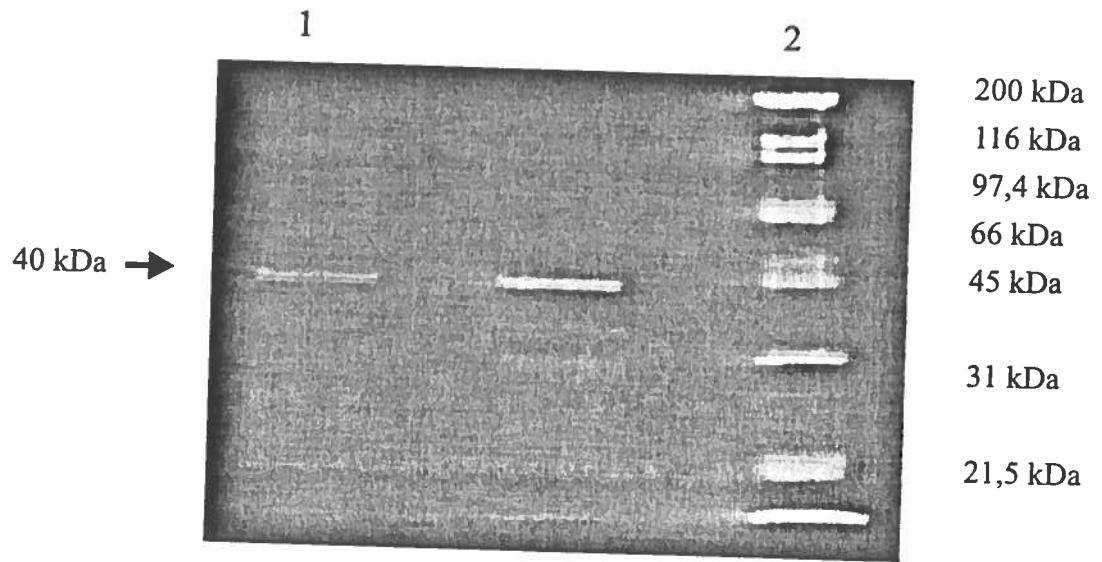
- 1: PCR avec le clone mutant P31L
- 2: PCR avec le clone mutant D42N
- 3: PCR avec le clone mutant D99N
- 4: PCR avec le clone mutant D42E
- 5: PCR avec le clone mutant P31W
- 6: PCR avec le clone mutant D99A
- 7: Marqueur 1 kb de Gibco BRL

**Figure 9** Expression de la partie unique de la protéine VP1, contenant l'activité PLA<sub>2</sub>, de type sauvage provenant de trois virus, PPV, *GmDNV* et B19 et provenant de PPV avec 5 mutations différentes.

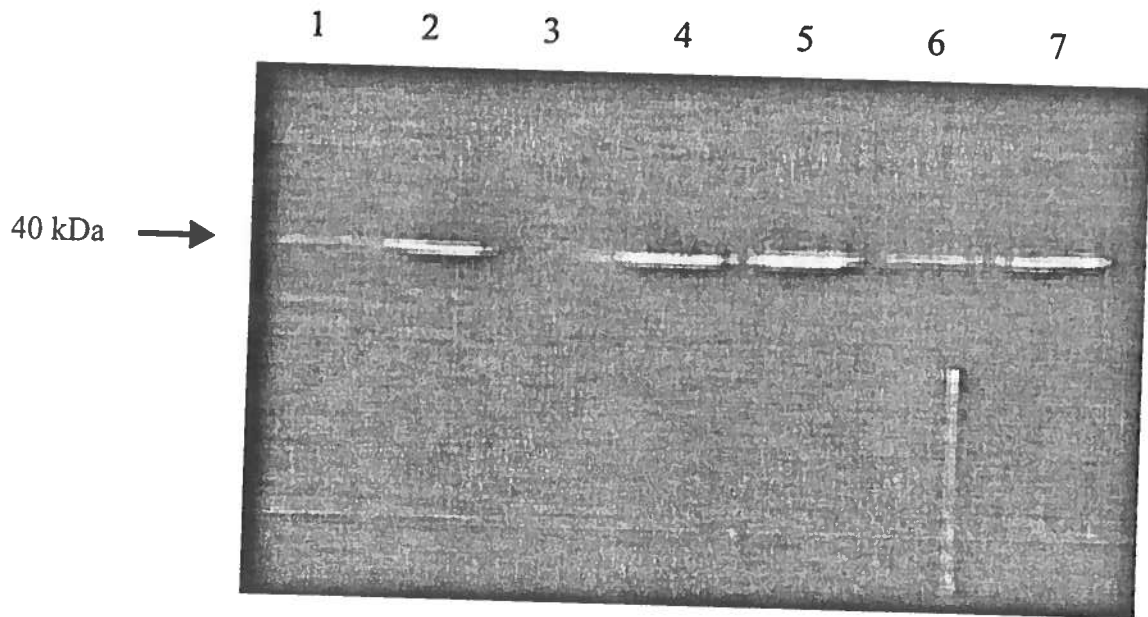


- 1: Échelle de masses moléculaires multiples "Broad Range Ladder" de BioRad, 1  $\mu$ L
- 2: 10  $\mu$ L de la protéine purifiée: VP1 de type sauvage (PPV)
- 3: 10  $\mu$ L de la protéine purifiée: VP1, mutant HD48AN
- 4: 10  $\mu$ L de la protéine purifiée: VP1, mutant H48A
- 5: 10  $\mu$ L de la protéine purifiée: VP1 de type sauvage (*GmDNV*)
- 6: 10  $\mu$ L de la protéine purifiée: VP1, mutant D99A
- 7: 10  $\mu$ L de la protéine purifiée: VP1, mutant D49A
- 8: 10  $\mu$ L de la protéine purifiée: VP1, mutant D42N
- 9: 10  $\mu$ L de la protéine purifiée: VP1 de type sauvage (B19)
- 10: Échelle de masses moléculaires multiples "Broad Range Ladder" de BioRad, 1  $\mu$ L

**Figure 10** Expression de la partie unique de la protéine VP1 du PPV, contenant l'activité PLA<sub>2</sub>, avec les mutations P31W, H48A, HD48AN, D42E, D99N, P31L et P31R.



- 1: 10  $\mu$ L de la protéine purifiée: VP1, mutant P31W  
2: Échelle de masses moléculaires multiples "Broad Range Ladder" de BioRad, 1  $\mu$ L



- 1: 10  $\mu$ L de la protéine purifiée: VP1, mutant H48A  
2: 10  $\mu$ L de la protéine purifiée: VP1, mutant HD48AN  
3: puit vide  
4: 10  $\mu$ L de la protéine purifiée: VP1, mutant D42E  
5: 10  $\mu$ L de la protéine purifiée: VP1, mutant D99N  
6: 10  $\mu$ L de la protéine purifiée: VP1, mutant P31L  
7: 10  $\mu$ L de la protéine purifiée: VP1, mutant P31R

**Tableau VI** Différents tests d'activité enzymatique des PLA<sub>2</sub> de la capsid du B19 et du PPV.



Tests d'activité	Résultats avec B19	Résultats avec PPV
Variation de la concentration en Ca <sup>2+</sup>		
1 μM	9,6 %	8,6 %
1 mM	105,9 %	68,0 %
10 mM	100 %	100 %
EDTA (10 mM) au lieu de Ca <sup>2+</sup>	3,8 %	2,5 %
EGTA (10 mM) au lieu de Ca <sup>2+</sup>	5,0 %	3,2 %
Inhibiteurs		
CI <sub>50</sub> , manoalide à pH 8,0	2,8 ± 0,4 μM	2,0 ± 0,3 μM
CI <sub>50</sub> , oleyloxyéthylphosphoryl choline à pH 8	>20 μM	11,1 ± 0,9 μM

ou l'EGTA à des concentrations de 10 mM, l'activité se situe entre 2,5 % et 5 % pour les deux molécules avec les deux virus.

### 3.2 Inhibiteurs de la PLA<sub>2</sub>

Deux inhibiteurs de la PLA<sub>2</sub> ont été utilisés pour vérifier leurs effets sur l'activité PLA<sub>2</sub> des capsides du B19 et du PPV. La concentration inhibitrice requise pour réduire l'activité de 50% (CI50) a été mesurée pour les deux inhibiteurs, le manoalide et l'oleyloxyéthyl phosphorylcholine (OP), avec les capsides des deux virus, B19 et PPV. Les valeurs obtenues pour le manoalide sont de 2,8 µM et 2,0 µM tandis que les valeurs de CI50 obtenues pour l'inhibiteur OP sont de >20 µM et de 11,1 µM.

## 4. Chromatographie sur couche mince

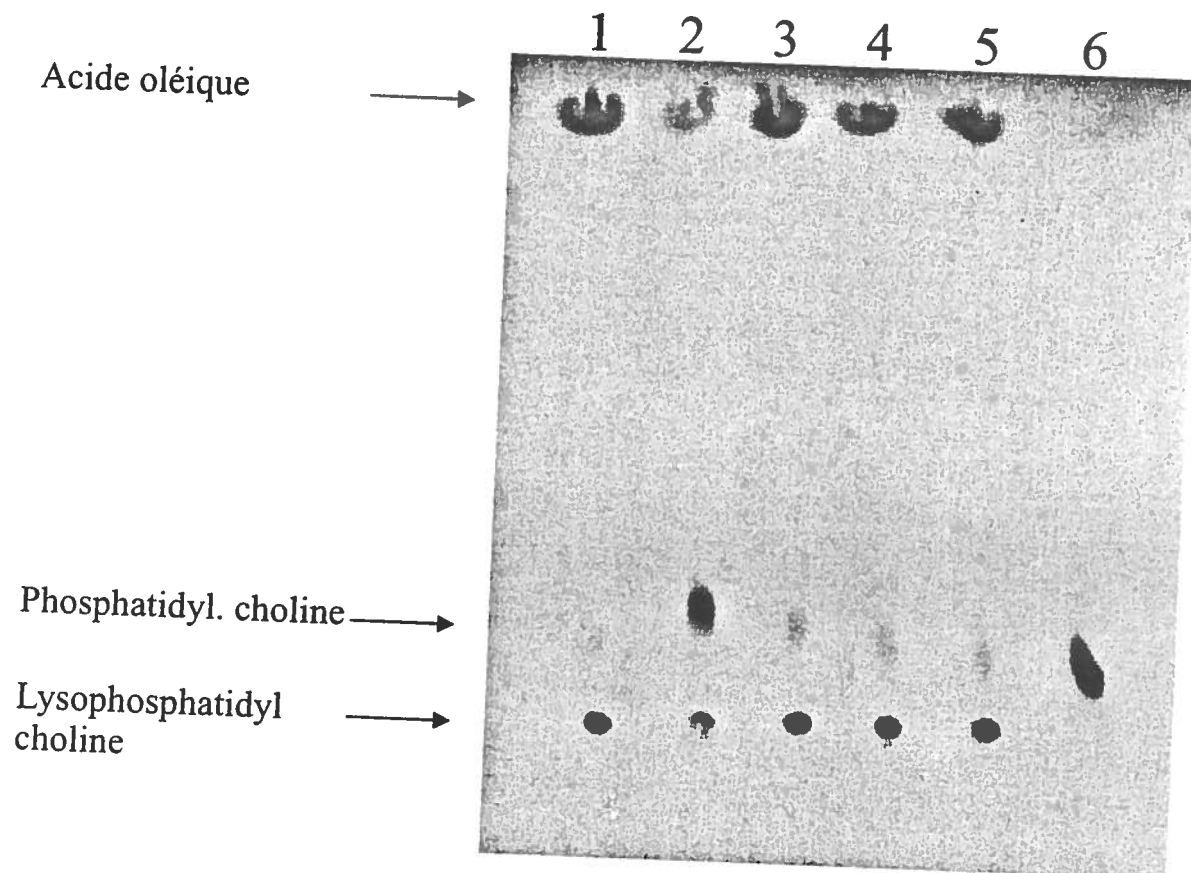
### 4.1 Résultats de la digestion de phosphatidyl choline

La figure 11 illustre les résultats obtenus lors de la séparation par chromatographie sur couche mince des différents composés résultants du clivage protéolytique du phosphatidyl choline par la PLA<sub>2</sub>. Les deux dernières colonnes sont réservées aux contrôles positif et négatif. Dans l'avant-dernière colonne, le substrat, le phosphatidyl choline, est clivé par la PLA<sub>2</sub> provenant du venin d'abeille. Le substrat est donc presque entièrement clivé ce qui donne de l'acide oléique et le lysophosphatidyl choline. Seules des traces du substrat, le phosphatidyl choline, sont encore présentes. La sixième colonne comprend le contrôle négatif, c'est-à-dire le substrat non-clivé. Les résultats obtenus avec le PPV et le B19 seront comparés à ces deux contrôles.

Dans la première colonne, le clivage par le PPV a produit de l'acide oléique et du lysophosphatidyl choline. Lorsque l'anticorps monoclonal 3C9 (spécifique pour le PPV) est ajouté, l'acide oléique et le lysophosphatidyl choline sont en faible quantité alors que le phosphatidyl choline est toujours présent. Dans la troisième colonne, la réaction est effectuée avec le B19. Le résultat est le même qu'avec le PPV. L'ajout de l'anticorps monoclonal 3C9 au virus B19 donne exactement les mêmes résultats, c'est-à-dire la présence d'acide oléique et de lysophosphatidyl choline, sans effet de l'anticorps.

**Figure 11** Chromatographie sur couche mince: résultats de la digestion d'un phosphatidyl choline marqué radioactivement par les capsides de deux virus et par la PLA<sub>2</sub> provenant du venin d'abeille.

## Chromatographie sur couche mince



- 1: PPV
- 2: PPV + 3C9 (anticorps monoclonal dirigé contre PPV)
- 3: B19
- 4: B19 + 3C9
- 5: Venin d'abeille (contrôle positif)
- 6: contrôle négatif

## 4.2 Activité enzymatique des mutants

La membrane de chromatographie sur couche mince illustrée à la figure 12, permet de vérifier la présence ou l'absence d'activité enzymatique PLA<sub>2</sub> chez différents mutants. Sur cette membrane, les mutants P31L, P31W, D42N et D99N sont analysés. Les cinq premières colonnes donnent les résultats de la digestion du phosphatidyl choline par la PLA<sub>2</sub> de type sauvage et ce pour cinq dilutions différentes. Ces colonnes servent de contrôles positifs. Les quatre premières dilutions ont des patrons de digestion semblables, c'est-à-dire qu'on y observe la présence d'acide oléique et de lysophosphatidyl choline et qu'il reste très peu de phosphatidyl choline, le substrat de départ. Le phosphatidyl choline est cependant présent pour la dilution 1/3000.

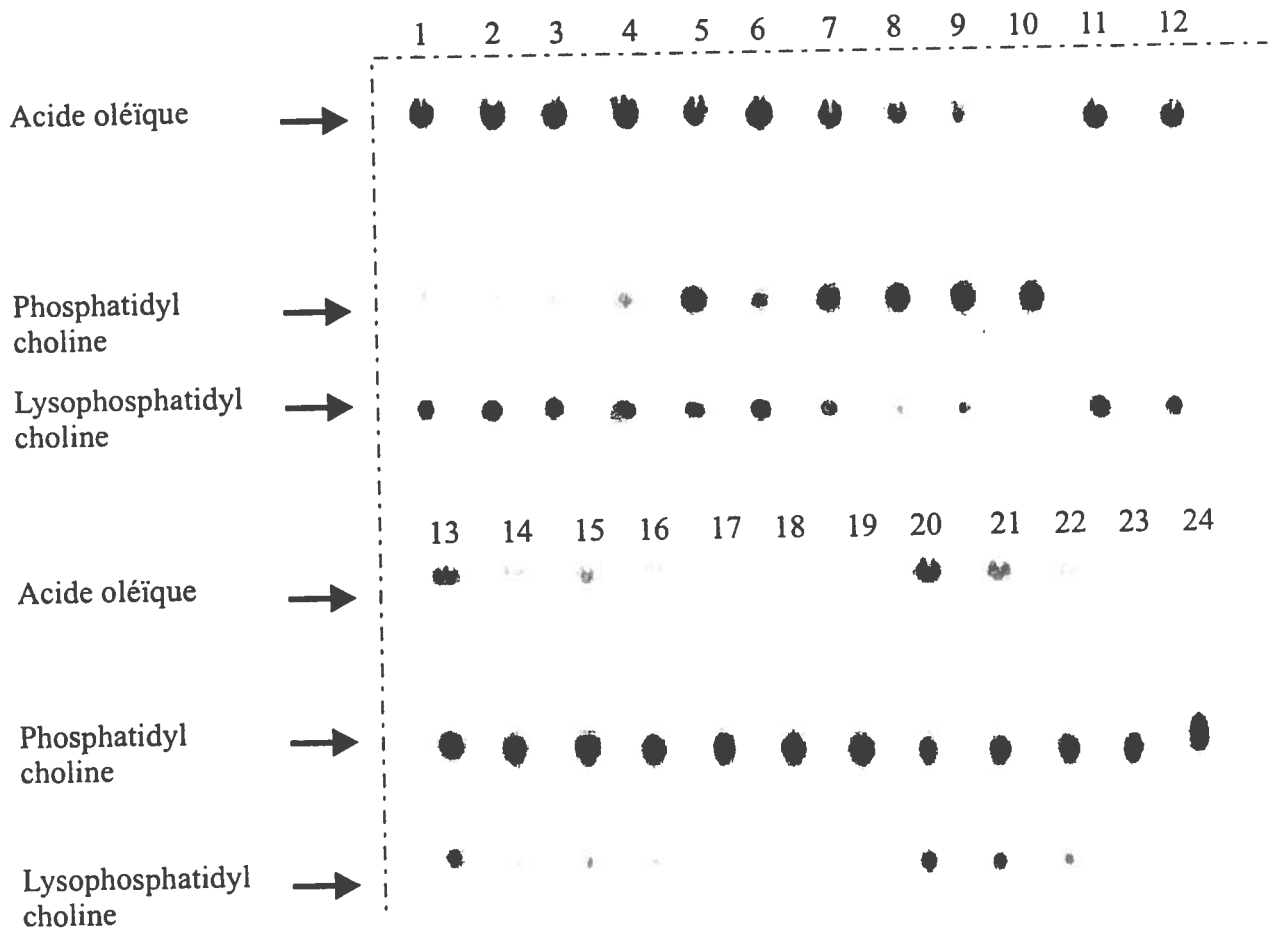
Le mutant P31L a été dilué de la même façon que le contrôle positif. Les trois composés sont présents dans les trois dilutions mais la phosphatidyl choline est en faible quantité à la dilution 1/30 tandis que la quantité d'acide oléique et de lysophosphatidyl choline diminue avec la dilution qui augmente. Les résultats sont semblables pour le mutant P31W. Pour la dilution la plus faible, le substrat de départ est absent mais la quantité augmente avec la dilution, alors que les deux autres composés sont de moins en moins importants.

La quantité d'acide oléique diminue avec chaque dilution du mutant D42N. Le mutant D99N, lorsqu'il est dilué, donne très peu d'acide oléique et de lysophosphatidyl choline, mais lorsqu'il n'est pas dilué, la présence d'acide oléique et de lysophosphatidyl choline est observée. La dernière colonne représente le témoin négatif où seule la présence de phosphatidyl choline est observée.

## 4.3 Activité PLA<sub>2</sub> spécifique relative

Le tableau VII résume les résultats obtenus pour vérifier l'activité enzymatique PLA<sub>2</sub> des protéines VP1 mutantes en la comparant avec celle de la VP1 de type sauvage. La première colonne indique la quantité en ng de PLA<sub>2</sub> nécessaire pour obtenir 50% d'hydrolyse du phosphatidyl choline en acide oléique et en lysophosphatidyl choline. La valeur la moins élevée, 0,5 ng, appartient à la VP1 de type sauvage. Le mutant nécessitant la plus petite quantité de PLA<sub>2</sub> pour obtenir le même résultat est le mutant P31L. Le mutant HD48AN requière la quantité la plus importante de VP1, soit 10 600 ng.

**Figure 12**    Activité enzymatique de la PLA<sub>2</sub> virale sauvage et possédant les mutations P31L, P31W, D42N et D99N: chromatographie sur couche mince.



1: PLA<sub>2</sub> de type sauvage, dilution 1/30  
 2: PLA<sub>2</sub> de type sauvage, dilution 1/100  
 3: PLA<sub>2</sub> de type sauvage, dilution 1/300  
 4: PLA<sub>2</sub> de type sauvage, dilution 1/1000  
 5: PLA<sub>2</sub> de type sauvage, dilution 1/3000

6: PLA<sub>2</sub>, mutant P31L, dilution 1/30  
 7: PLA<sub>2</sub>, mutant P31L, dilution 1/100  
 8: PLA<sub>2</sub>, mutant P31L, dilution 1/300  
 9: PLA<sub>2</sub>, mutant P31L, dilution 1/1000  
 10: PLA<sub>2</sub>, mutant P31L, dilution 1/3000

11: PLA<sub>2</sub>, mutant P31W  
 12: PLA<sub>2</sub>, mutant P31W, dilution 1/10  
 13: PLA<sub>2</sub>, mutant P31W, dilution 1/100  
 14: PLA<sub>2</sub>, mutant P31W, dilution 1/1000

15: PLA<sub>2</sub>, mutant D42N, dilution 1/10  
 16: PLA<sub>2</sub>, mutant D42N, dilution 1/30  
 17: PLA<sub>2</sub>, mutant D42N, dilution 1/100  
 18: PLA<sub>2</sub>, mutant D42N, dilution 1/300  
 19: PLA<sub>2</sub>, mutant D42N, dilution 1/1000

20: PLA<sub>2</sub>, mutant D99N  
 21: PLA<sub>2</sub>, mutant D99N, dilution 1/3  
 22: PLA<sub>2</sub>, mutant D99N, dilution 1/10  
 23: PLA<sub>2</sub>, mutant D99N, dilution 1/30

24: contrôle négatif

**Tableau VII** Activité de la PLA<sub>2</sub> de la partie unique de la VP1 de PPV selon la mutation.



Mutants	Activité PLA <sub>2</sub> de la partie unique de VP1	
	ng de protéine pour avoir 50% d'hydrolyse	Activité spécifique relative
type sauvage	0,5	100
P31L	6,1	7,5
P31R	694	0,066
P31W	12,2	3,19
D42E	189	0,24
D42N	2090	0,022
H48A	6900	0,007
D49N	1150	0,04
HD48AN	10 600	0,004
D99A	8600	0,005
D99N	498	0,092

Une autre façon de comparer les activités enzymatique des mutants avec celle du type sauvage est l'activité spécifique relative où l'activité de la VP1 de type sauvage est établie à 100. L'activité relative se rapprochant la plus de celle du type sauvage est celle du mutant P31L et le mutant dont l'activité enzymatique diffère le plus de celle du type sauvage est le mutant HD48AN.

## **5. Transfections**

### **5.1 Immunofluorescence**

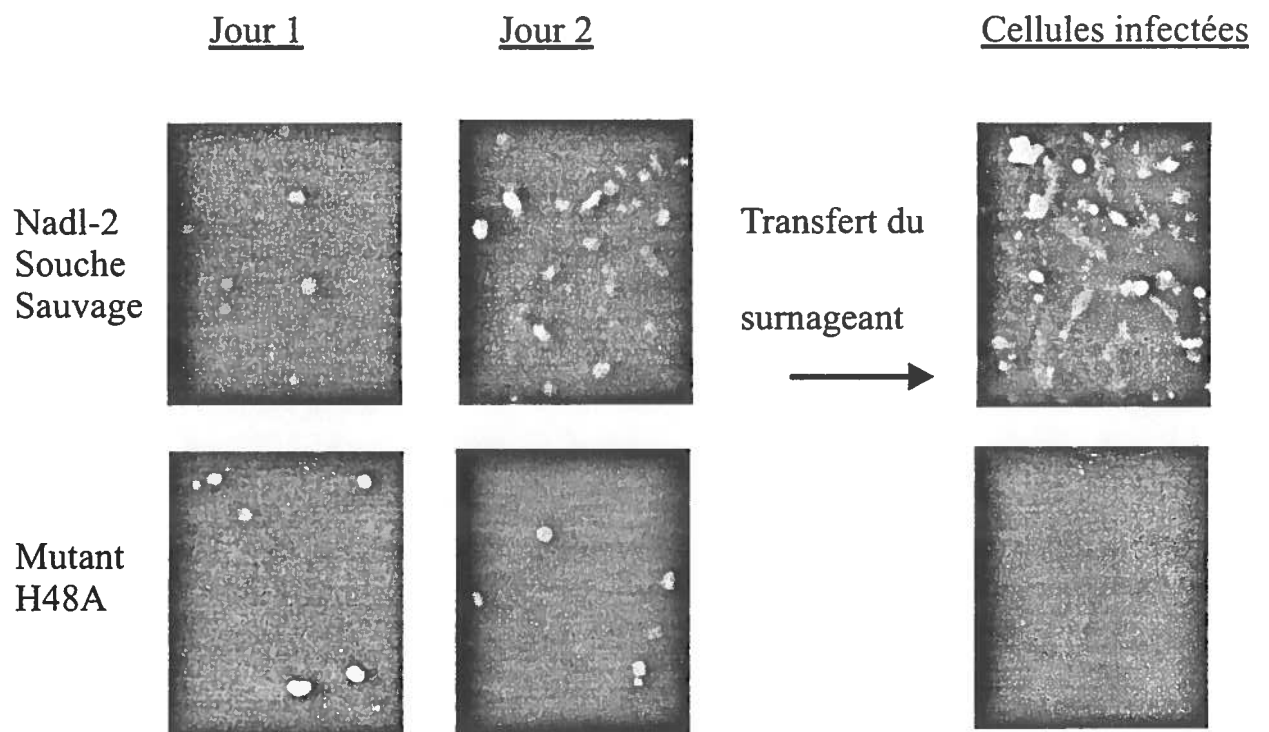
La transfection des cellules PT avec les clones infectieux sauvages ou mutés permettait la production de particules virales durant les deux jours suivants la transfection. La présence de ces particules virales est illustrée à la figure 13 alors qu'on dénote la présence de particules fluorescentes dans les cellules PT transfectées après immunofluorescence. Les résultats illustrés dans cette figure démontrent que le mutant H48A et le clone infectieux sauvage NADL-2 produisent tous les deux du virus. Les particules virales sont retrouvées ensuite dans le surnageant ce qui permet l'infection de nouvelles cellules PT avec les surnageants provenant des transfections. Après infection avec le surnageant, seules les cellules infectées avec les virus produits par transfection avec le clone infectieux sauvage sont fluorescentes démontrant la présence de particules virales. Les cellules infectées avec les virus provenant de la transfection de cellules PT avec le clone infectieux muté ne sont pas fluorescentes car il n'y a pas de particules virales.

### **5.2 Infectivité des mutants**

Le tableau VIII indique quelle est l'infectivité relative de chacun des virus provenant des clones infectieux mutés transfectés dans des cellules PT et dont les surnageants ont été récupérés. L'infectivité des virus provenant de la transfection du clone infectieux sauvage a été établie à 1 pour permettre une comparaison avec les virus provenant de la transfection de clones infectieux mutés. Par exemple, pour le mutant P31L, il faudrait 162 particules virales de plus de ce mutant pour obtenir la même infectivité que celle du virus de type sauvage. L'infectivité la plus basse appartient au clone D99A qui doit fournir 347 000 particules virales de plus pour obtenir une infectivité équivalente à celle du virus provenant du clone infectieux sauvage.

**Figure 13**      Résultat de la transfection de cellules PT avec le clone infectieux sauvage et avec le clone infectieux possédant la mutation H48A. L'anticorps utilisé pour l'immunofluorescence est l'anticorps monoclonal 3C9

Transfection de cellules PT avec le clone infectieux  
sauvage ou possédant la mutation H48A



**Tableau VIII Résultats des transfections et infectivité des virus**

Mutants transfectés	Résultats des transfections
H48A	aucune infection
D49N	aucune infection
HD48AN	aucune infection
HD48AN – HD	infection restaurée
P31L	infection avec titre faible
D42N	aucune infection
D99A	aucune infection

Mutants	Infectivité des virus Infectivité virale relative
type sauvage	1
P31L	1/162
P31R	1/87 100
P31W	1/1820
D42E	1/1410
D42N	1/53 700
H48A	1/93 300
D49N	1/81 300
HD48AN	1/93 300
D99A	1/347 000
D99N	1/145 000

## **DISCUSSION**

## 1. Mutagenèse dirigée

Le protocole de mutagenèse utilisé, QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit, a permis d'effectuer toutes les mutations voulues au niveau de la partie unique de la VP1 du PPV, région où est située la PLA<sub>2</sub> virale. Certaines amorces étaient conçues de façon à pouvoir vérifier la présence de la mutation par digestion avec une enzyme de restriction dont le site de restriction avait été créé ou éliminé. Dans ces cas, les digestions des clones mutants étaient comparées à la digestion du plasmide original non muté pour observer la différence dans le nombre de bandes présentes et la taille des bandes. Le mutant D42E acquiert le site de restriction pour l'enzyme *Pst* I, le mutant D42N acquiert le site de restriction *Pvu* II et les mutants D99A et D99N perdent leur site de restriction *Pvu* II. Les autres mutants, P31L, P31R, P31W, H48A, D49N et HD48AN ne peuvent être analysés que par séquençage. Toutes les mutations ont pu être obtenues et le séquençage a permis de s'assurer que les mutations étaient bien présentes en plus de nous confirmer qu'il n'y avait pas de mutations supplémentaires présentes dans le cadre de lecture ouvert de la partie unique de la VP1.

## 2. Expression de la partie unique de la VP1 du PPV

### 2.1 Expression dans le système pBAD/Thio

L'expression des protéines a été effectuée avec un système d'expression bactérienne utilisant *E. coli* et le vecteur pBAD/Thio modifié (chapitre Matériel et méthodes, section 2.3). Ce système a permis d'obtenir des quantités importantes de protéines pour chacun des mutants de la partie unique de la VP1 de PPV possédant l'activité PLA<sub>2</sub> (chapitre Résultats, section 2). Les figures 9 et 10 permettent de confirmer la présence des différentes protéines, mutantes ou sauvages. Les protéines obtenues proviennent des 10 mutations effectuées dans la partie unique de la VP1 clonée dans le plasmide VPi, puis sous-clonées dans le vecteur pBAD, vecteur d'expression pour un système bactérien. Ces protéines ont été vérifiées sur un gel de polyacrylamide après leur purification sur une colonne de Ni-agarose et avant la dialyse et le clivage avec la protéase TEV.



### 3. Tests d'activité PLA<sub>2</sub> des capsides de B19 et de PPV

Différentes expériences préliminaires ont été effectuées dans le but d'évaluer s'il était possible que les capsides de deux parvovirus, le B19 et le PPV, possèdent une activité PLA<sub>2</sub>. Dans un premier temps, la présence d'une certaine concentration en calcium est essentielle pour permettre une réaction enzymatique avec les PLA<sub>2</sub> sécrétées. Dans un deuxième temps, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques pour la PLA<sub>2</sub> et dont les concentrations inhibitrices requises pour réduire l'activité enzymatique de 50% sont connues permettra de vérifier si la même inhibition est retrouvée chez les capsides des deux parvovirus.

#### 3.1 Concentration en calcium

Les résultats du tableau VI indiquent que l'activité enzymatique optimale pour les deux capsides est obtenue lorsque la concentration en calcium est de 1 à 10 mM. Les PLA<sub>2</sub> sécrétées requièrent des concentrations en calcium de l'ordre du mM pour une activité enzymatique optimale (Dennis, 1997). Les PLA<sub>2</sub> virales requièrent donc des concentrations en calcium semblables à celles requises par les PLA<sub>2</sub> sécrétées.

#### 3.2 Les inhibiteurs de PLA<sub>2</sub>

Deux inhibiteurs des PLA<sub>2</sub> ont été utilisés pour vérifier si leurs actions inhibitrices des PLA<sub>2</sub> sécrétées étaient les mêmes que chez les PLA<sub>2</sub> virales. Dans les deux cas, avec le manoalide et l'OP, la concentration inhibitrice requise pour réduire de 50% l'activité PLA<sub>2</sub> de la VP1 du PPV et de B19 se situait dans l'intervalle des CI50 pour les PLA<sub>2</sub> sécrétées provenant de différents groupes. Les résultats obtenus avec la PLA<sub>2</sub> virale provenant du PPV et du B19 étaient de 2,0 µM et 2,8 µM ce qui se situe dans l'intervalle des CI50 pour les PLA<sub>2</sub> sécrétées, c'est-à-dire entre 0,02 µM et 4,7 µM.

Le deuxième inhibiteur utilisé, l'oleyloxyéthyl phosphorylcholine ou OP, inhibe la PLA<sub>2</sub> pancréatique de porc (CI50 = 6,2 µM) et la PLA<sub>2</sub> sécrétée recombinante humaine (CI50 = 13,7 µM) (Hope, Chen et Morgan, 1993). Pour ce qui est des CI50 pour l'activité enzymatique des PLA<sub>2</sub> des capsides du B19 et du PPV, les valeurs obtenues sont de 11,1 µM et de plus de 20 µM. La première valeur, obtenue avec les capsides du PPV, se situe dans l'intervalle des CI50 obtenues

avec les PLA<sub>2</sub> sécrétées, c'est-à-dire entre 6,2 µM et 13,7 µM. La valeur obtenue avec les capsides du B19 est un peu plus élevée que les valeurs retrouvées dans la littérature.

L'inhibition de l'activité PLA<sub>2</sub> des capsides du B19 et du PPV avec des concentrations en inhibiteurs semblables à celles utilisées pour inhiber l'activité de PLA<sub>2</sub> sécrétées donne des arguments supplémentaires à la théorie selon laquelle il y a présence d'une activité PLA<sub>2</sub> dans la capsidie des parvovirus.

#### **4. Activité PLA<sub>2</sub> de la partie unique de la VP1 du PPV**

##### **4.1 Activité enzymatique dans la capsidie du B19 et du PPV**

La présence des acides aminés du site catalytique de la PLA<sub>2</sub> dans la partie unique de la VP1 des parvovirus suggère la présence d'une activité PLA<sub>2</sub> dans cette protéine de la capsidie de ces virus. Il est donc important de vérifier si, tout d'abord, les capsides de ces virus (dont PPV et B19) possèdent bien cette activité enzymatique. La première expérience consiste donc à vérifier si les capsides de PPV et de B19 sont en mesure de cliver le phosphatidyl choline pour libérer un acide gras, l'acide oléique, et une molécule de lysophosphatidyl choline. La figure 11 permet de démontrer la présence d'une activité PLA<sub>2</sub> chez deux parvovirus: le PPV et le B19. De plus, la présence de l'anticorps monoclonal 3C9 spécifique à la région VP1-VP2 du PPV démontre que cette activité se situe au niveau des protéines de structure. L'ajout de l'anticorps monoclonal 3C9 ne modifie pas l'activité enzymatique du B19, mais diminue d'une façon dépendante de la dose celle du PPV, le 3C9 étant un anticorps spécifique à la capsidie de ce virus.

##### **4.2 Activité enzymatique des mutants**

Une fois la présence d'une activité PLA<sub>2</sub> bien établie chez PPV, la prochaine étape consiste à confirmer cette activité en démontrant que la mutation des acides aminés du site catalytique de la PLA<sub>2</sub> présents dans le génome de la partie unique de la VP1 de PPV diminue ou élimine l'activité enzymatique de la protéine VP1.

Par mutagenèse dirigée, 10 mutants ont été produits (chapitre Matériel et méthodes, section 2). Ces mutants permettent de modifier un à un tous les acides aminés importants du site

catalytique de la PLA<sub>2</sub>. De plus, un acide aminé très conservé chez les PLA<sub>2</sub> et chez les parvovirus, l'acide aspartique en position 42, a été muté bien que sa fonction soit inconnue.

La figure 12 permet d'observer les résultats obtenus avec 4 mutants différents: P31L, P31W, D42N et D99N. L'absence d'activité enzymatique est remarquable chez le mutant D42N. L'acide aspartique en position 42, bien qu'aucune fonction ne lui soit attribuée, semble très important dans le site catalytique de la PLA<sub>2</sub> du virus.

Le mutant D99N démontre aussi une forte baisse d'activité enzymatique. Cet acide aminé est très important dans le site catalytique de l'enzyme car il permet le clivage au niveau du deuxième carbone du phospholipide en agissant avec l'histidine en position 48 pour polariser la molécule d'eau et lui permettre ainsi de catalyser la réaction (figure 3). Une mutation au niveau de cet acide aminé réduit donc d'une manière importante l'activité enzymatique de la protéine.

Le mutant P31L perd aussi partiellement son activité enzymatique. Cet acide aminé est responsable de liaison avec le substrat, le phospholipide, et chez les PLA<sub>2</sub>, c'est parfois une leucine qui se retrouve à la position 31, mais jamais une proline. En remplaçant la proline retrouvée de manière très conservée chez les parvovirus avec la leucine retrouvée chez certaines PLA<sub>2</sub>, l'activité enzymatique demeure importante. Le même résultat est observé avec les mutants P31W et P31R car chez certaines PLA<sub>2</sub>, c'est un tryptophane ou une arginine qui remplace la leucine à la position 31.

### 4.3 Activité PLA<sub>2</sub> spécifique relative

Les résultats regroupés dans le tableau VII permettent de comparer l'activité PLA<sub>2</sub> des mutants avec elle de la VP1 sauvage dont l'activité relative a été établie à 1. Le mutant P31L possède une activité se rapprochant le plus de celle de la VP1 de type sauvage. Étant donné que certaines PLA<sub>2</sub> possèdent l'acide aminé leucine à la position 31, il est possible que cette mutation chez le virus permette de conserver une certaine activité enzymatique. Cet acide aminé est important lors de la liaison avec le substrat. Ces résultats indiquent que la présence d'une proline à cette position donne une activité optimale pour la PLA<sub>2</sub> virale, mais que lorsque cet acide aminé est remplacé par un acide aminé retrouvé chez d'autres PLA<sub>2</sub>, comme la leucine ou le tryptophane, la PLA<sub>2</sub> virale conserve une certaine activité.

Les protéines VP1 mutées dont la mutation affecte un acide aminé important pour l'hydrolyse du substrat ou pour la liaison au calcium ont des activités PLA<sub>2</sub> très faibles puisque les mutations touchent des acides aminés essentiels pour l'hydrolyse du substrat et la libération d'un acide gras. La diminution de l'activité PLA<sub>2</sub> des mutants D42E et D42N indiquent que ces acides aminés sont très importants dans le site catalytique de la PLA<sub>2</sub> bien qu'aucune fonction ne soit connue pour cet acide aspartique conservé dans la séquence des PLA<sub>2</sub> et des VP1 des parvovirus.

## **5. Transfections des clones infectieux mutants et sauvages**

### **5.1 Infectivité des clones infectieux**

Les clones infectieux mutants et sauvage possèdent le génome complet du PPV sans mutation dans le cas du clone infectieux sauvage et avec dix mutations différentes pour chacun des dix différents mutants. La transfection de cellules permissives avec ces clones infectieux permet d'obtenir des particules virales complètes dans le surnageant des cellules transfectées. Il est possible de vérifier l'infectivité des particules virales obtenues en utilisant le surnageant pour infecter des cellules permissives. La production de particules virales par ces cellules permettra de démontrer l'infectivité des clones infectieux utilisés au départ pour la transfection. Il sera alors possible de déterminer si les mutations réduisent ou éliminent l'infectivité du PPV.

Les transfections effectuées avec les clones infectieux mutants et le clone infectieux sauvage (chapitre Résultats, section 5.1) démontrent que tous les clones infectieux produisent des particules virales durant les deux jours suivants la transfection. Ceci indique que les différentes mutations n'affectent en rien la production de particules virales complètes dans les cellules permissives. Les particules virales ont servi ensuite à l'infection de cellules PT. C'est à ce moment que la présence de mutations dans les particules virales prend son importance. L'infectivité des mutants a été grandement réduite.

Le mutant D42N perd presque toute son infectivité, mais dans ce cas, l'acide aminé modifié, un acide aspartique en position 42, n'a pas encore été associé à une fonction précise au niveau du site catalytique ou au niveau de la liaison de la PLA<sub>2</sub> avec une micelle de substrat ou avec un phospholipide. Néanmoins, cet acide aminé est très conservé chez les PLA<sub>2</sub> et les résultats des transfections démontrent bien qu'il est très probable qu'il joue un rôle dans le site

catalytique ou dans la liaison du substrat en plus de jouer un rôle important dans l'infectivité du PPV.

Le mutant HD48AN a été utilisé pour vérifier si les résultats obtenus provenaient bien des mutations effectuées et non du processus de mutagenèse. Ce mutant a donc retrouvé sa forme sauvage, HD48, par mutagenèse dirigée et l'infectivité a été restaurée, démontrant ainsi que la modification de ces deux acides aminés était responsable de la diminution de l'infectivité.

## 5.2 Infectivité relative des particules virales mutantes

De façon plus quantitative, le tableau VIII indique les infectivités relatives de tous les mutants utilisés lors des transfections. La valeur de 1 a été attribuée au clone infectieux sauvage et l'infectivité des clones mutants est donc relative à cette infectivité. Deux mutants au niveau de la position 31, P31L et P31W, possèdent une infectivité plus élevée que les autres mutants. Ces mutations affectent un acide aminé qui, chez la PLA<sub>2</sub>, est important lors de la liaison avec le substrat. La nature de cet acide aminé chez les PLA<sub>2</sub> est variable et on peut y retrouver une leucine ou un tryptophane. Cependant, la proline est l'acide aminé retrouvé à cet position chez tous les parvovirus donc l'infectivité optimale est obtenue avec cet acide aminé.

Les mutants dont l'infectivité a le plus diminué sont les mutants D99N, D99A, H48A et HD48AN. Ces acides aminés font partie du site catalytique de la PLA<sub>2</sub>. L'acide aspartique à la position 99 et l'histidine à la position 48 forment une diade essentielle à l'activité enzymatique de la PLA<sub>2</sub>. La mutation de l'un ou l'autre de ces deux acides aminés réduit de façon très importante l'activité PLA<sub>2</sub> du virus. Cette activité enzymatique semble être importante lors de l'infection de cellules permissives avec le PPV puisque des mutations réduisant l'activité enzymatique font perdre toute infectivité au virus.

La diminution ou l'absence d'infectivité des particules virales mutées démontre que la présence d'une activité PLA<sub>2</sub> dans la capsid des PPV est essentielle aux premières étapes de l'infection virale. Les étapes tardives de l'infection, l'assemblage, l'encapsidation et la lyse cellulaire ne semblent pas être affectées par ces mutations puisque les transfections de clones infectieux mutés ont permis la production de particules virales dans tous les cas. Les effets des mutations de la VP1 sur l'entrée du virus dans la cellule permissive indiquent l'importance de cette protéine dans les premières étapes de l'infection. Les expériences de Cotmore (Cotmore *et*

*al.*, 1999) démontrent le rôle de la VP1 dans l'infection virale du MVM. La VP1 serait importante dans les étapes suivant la liaison de la capsid virale avec les récepteurs cellulaires. Un stimulus encore inconnu permettrait à la VP1 jusqu'à ce moment situé à l'intérieur de la capsid d'être externalisée et d'entrer en fonction. La fonction de la VP1 pourrait être celle d'un second récepteur permettant l'internalisation du virus et le relâchement des capsides vers l'intérieur de la cellule. La présence d'une activité enzymatique PLA<sub>2</sub> au niveau de la VP1 de la capsid du PPV aurait son importance à ce niveau, jouant le rôle du second récepteur se liant aux phospholipides de la membrane de la cellule infectée. Des recherches seront effectuées suite à ce projet pour mieux comprendre les étapes de l'infection du PPV, de la liaison de la capsid avec les récepteurs cellulaires jusqu'à la libération de l'ADN viral dans le noyau de la cellule. L'identification de ces étapes est primordiale pour comprendre le rôle de l'activité enzymatique de la capsid lors des premières étapes de l'infection virale.

## **CONCLUSION**

La séquence en acides aminés des parvovirus au niveau de la partie unique de la protéine VP1 de la capsid est très conservée parmi tous les parvovirus. Certains acides aminés sont notamment retrouvés chez tous les parvovirus en plus d'être retrouvés dans la séquence en acides aminés des phospholipases A<sub>2</sub>, un groupe de protéines très diversifié dont certaines PLA<sub>2</sub> proviennent du liquide synovial humain, du liquide pancréatique, du venin de serpent, du venin d'abeille ou encore des macrophages P388D<sub>1</sub> de souris. Les PLA<sub>2</sub> possèdent aussi des acides aminés très conservés parmi les cinq groupes de PLA<sub>2</sub> et certains de ces acides aminés retrouvés chez toutes les PLA<sub>2</sub> font partie du site catalytique de l'enzyme. Étant donné que la conservation des acides aminés importants du site catalytique de l'enzyme PLA<sub>2</sub> est évidente autant du côté des parvovirus que du côté des PLA<sub>2</sub>, la présence d'une activité enzymatique PLA<sub>2</sub> chez les parvovirus au niveau de la VP1 de la capsid devient une théorie intéressante.

Les expériences effectuées lors de ce projet de maîtrise ont réussi à démontrer qu'il existe une activité PLA<sub>2</sub> dans la capsid de deux parvovirus, le parvovirus humain B19 et le parvovirus porcin. Ces deux capsides présentaient les mêmes caractéristiques que les PLA<sub>2</sub> sécrétées que ce soit au niveau de l'utilisation du calcium ou au niveau de l'effet d'inhibiteurs spécifiques des PLA<sub>2</sub> sur l'activité enzymatique des capsides des deux parvovirus.

La production de mutants VP1 a permis de démontrer que les acides aminés du site catalytique de la PLA<sub>2</sub> sont responsables de l'activité enzymatique de la protéine. En mutant ces acides aminés, l'activité PLA<sub>2</sub> de la protéine est réduite d'une façon très significative.

Finalement, la présence de mutations affectant le site catalytique de l'enzyme dans les capsides des particules virales produites par la transfection de cellules permissives avec des clones infectieux mutés a permis de démontrer que l'importance de la présence d'un site catalytique PLA<sub>2</sub> chez le PPV se situe au niveau de l'infectivité du virus. En effet, les particules virales mutées perdaient leur infectivité tandis que les particules sauvages produites par la transfection de cellules permissives avec le clone infectieux sauvage conservaient leur infectivité. Il a été démontré dans la littérature (Cotmore *et al.*, 1999) que la protéine VP1 de certains parvovirus jouerait un rôle important lors de l'entrée du virus dans la cellule. C'est après la liaison de la capsid avec la cellule que la VP1 serait externalisée grâce à un stimulus qui n'a pas encore été identifié. L'activité enzymatique PLA<sub>2</sub> de la VP1 pourrait avoir son importance lors de cette étape de l'entrée du virus en devenant le second récepteur permettant l'internalisation. Des recherches plus poussées pour bien comprendre et définir toutes les étapes de l'entrée du PPV



dans les cellules permissives sont nécessaires à ce niveau pour tenter de comprendre le rôle exact de la VP1 et de son activité PLA<sub>2</sub> lors des premières étapes de l'infection au PPV.

La présence d'une activité enzymatique au niveau de la capsid d'un virus retient l'attention puisque les capsides ont toujours eu leur importance au niveau de la protection du génome viral et au niveau de liaison avec les récepteurs cellulaires. Nos recherches permettent de penser que les parvovirus ne sont pas les seuls virus à posséder une activité enzymatique au niveau de leurs capsides et que les capsides pourraient jouer un rôle beaucoup plus actif dans l'infection virale.

---

## **LISTE DES RÉFÉRENCES**

- AGBANDJE, M., C. R. Parrish, M. G. Rossmann. 1995. "The Structure of Parvoviruses". Seminars in Virology. vol. 6, p.299-309.
- ANOUIA, Fatima, R. Wattiez, S. Mousset, P. Caillet-Fauquet.1997. "The Cytotoxicity of the Parvovirus Minute Virus of Mice Nonstructural Protein NS1 Is Related to Changes in the Synthesis and Phosphorylation of Cell Proteins". Journal of Virology. vol. 71, p. 4671-4678.
- ARELLA, M., S. Garzon, J. Bergeron, P. Tijssen. 1990. "Physicochemical Properties, Production, and Purification of Parvoviruses". Dans Handbook of Parvoviruses. vol. I, chap. 2. (Tijssen, P., ed.) CRC Press, Boca Raton, FL, p. 11-30.
- BALBOA, Maria A., Jesús Balsinde, Michelle V. Winstead, Jay A. Tischfield, Edward A. Dennis. 1996. "Novel Group V Phospholipase A<sub>2</sub> in Arachidonic Acid Mobilization in Murine P388D1 Macrophages". The Journal of Biological Chemistry. vol. 271, no. 50, p. 32381-32384.
- BERGERON, Jean, B. Hébert, P. Tijssen. 1996. "Genome Organization of the Kresse Strain of Porcine Parvovirus: Identification of the Allotropic Determinant and Comparaison with Those of NADL-2 and Field Isolates". Journal of Virology. vol. 70, p. 2508-2515.
- BERGERON, J., J. Menezes, P. Tijssen. 1993. "Genomic Organization and Mapping of Transcription and Translation Products of the NADL-2 Strain of Porcine Parvovirus". Virology. vol. 197, p. 86-98.
- BERUBE, Caroline, Lesley Mitchell, Earl Silverman, Michele David, Claire Saint Cyr, Ronald Laxer, Margaret Adams, Patsy Vegh, Maureen Andrew. 1998. "The Relationship of Antiphospholipid Antibodies to Thromboembolic Events in Pediatric Patients with Systemic Lupus Erythematosus: A Cross-Sectional Study". Pediatric Research. vol. 44, no. 3, p. 351-356.
- BRANDENBURGER, A., D. Legendre, B. Avalosse, J. Rommelaere. 1990. "NS1 and NS2 Proteins May Act Synergistically in the Cytopathogenicity of Parvovirus MVMP". Virology. vol. 174, p. 576-584.
- BROWN, K. E., N. S. Young. 1997. "Parvovirus B19 in Human Disease". Annual Review of Medecine. vol. 48, p. 59-67.

- CATER, Jean E., David J. Pintel. 1992. "The Small Non-structural Protein NS2 of the Autonomous Parvovirus Minute Virus of Mice Is Required for Virus Growth in Murine Cells". Journal of General Virology. vol. 73, p. 1839-1843.
- CHRISTENSEN, Jesper, Susan F. Cotmore, Peter Tattersall. 1997. "A Novel Cellular Site-Specific DNA-Binding Protein Cooperates with the Viral NS1 Polypeptide to Initiate Parvovirus DNA Replication". Journal of Virology. vol. 71, p. 1405-1416.
- CHRISTENSEN, Jesper, Michael Pedersen, Bent Aasted, Soren Alexandersen. 1995. "Purification and Characterization of the Major Nonstructural Protein (NS1) of Aleutian Mink Disease Parvovirus". Journal of Virology. vol. 69, p. 1802-1809.
- CHRISTENSEN, Jesper, Susan F. Cotmore, Peter Tattersall. 1995. "Minute Virus of Mice transcriptional Activator Protein NS1 Binds Directly to the Transactivation Region of the Viral P38 Promoter in a Strictly ATP-Dependent Manner". Journal of Virology. vol. 69, p. 5422-5430.
- CORMACK, Robert S., Imre E. Somssich. 1997. "Ultra-fast Alkaline Lysis Plasmid Extraction". Elsevier Trends Journal Technical Tips Online. p. 1-2.
- COTMORE, Susan F., Jesper Christensen, Jurg P. F. Nüesch, Peter Tattersall. 1995. "The NS1 Polypeptide of the Murine Parvovirus Minute Virus of Mice Binds to DNA Sequences Containing the Motif [ACCA]<sub>2-3</sub>". Journal of Virology. vol. 69, p. 1652-1660.
- COTMORE, Susan F., Anthony M. D'Abramo Jr., Luis F. Carbonell, Jessica Bratton, Peter Tattersall. 1997. "The NS2 Polypeptide of Parvovirus MVM Is Required for Capsid Assembly in Murine Cells". Virology. vol. 231, p. 1-14.
- COTMORE, Susan F., A. M. D'Abramo Jr., C. M. Ticknor, P. Tattersall. 1999. "Controlled Conformational Transitions in the MVM Virions Expose the VP1 N-Terminus and Viral Genome without Particle Disassembly". Virology. vol. 254, p.169-181.
- COTMORE, Susan F., Peter Tattersall. 1995. "DNA Replication in the Autonomous Parvoviruses". Seminars in Virology. vol. 6, p. 271-281.

- COTMORE, Susan F., Peter Tattersall. 1996. "Parvovirus DNA Replication". Dans DNA Replication in Eukaryotic Cells. chap. 28, p. 799-813. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- COTMORE, S. F., P. Tattersall. 1987. "The Autonomously Replicating Parvoviruses of Vertebrates". Advances in Virus Research. vol. 33, p. 91-174.
- DENNIS, Edward A. 1997. "The Growing Phospholipase A<sub>2</sub> Superfamily of Signal Transduction Enzymes". TIBS 22, p. 1-2.
- DENNIS, Edward A. 1994. "Diversity of Group Types, Regulation, and Function of Phospholipase A<sub>2</sub>". The Journal of Biological Chemistry. vol. 269, no. 18, p. 13057-13060.
- DOERIG, Christian, Bernhard Hirt, Jean-Philippe Antonietti, Peter Beard. 1990. "Nonstructural Protein of Parvovirus B19 and Minute Virus of Mice Controls Transcription". Journal of Virology. vol. 64, p. 387-396.
- DOUGHERTY, W. G., T. D. Parks. 1989. "Molecular Genetic and Biochemical Evidence for the Involvement of the Heptapeptide Cleavage Sequence in Determining the Reaction Profile at Two Tobacco Etch Virus Cleavage Sites in Cell-Free Assays". Virology. vol. 172, no. 1, p. 145-155.
- DOUGHERTY, W. G., T. D. Parks, S. M. Cary, J. F. Bazan, R. J. Fletterick. 1989. "Characterization of the Catalytic Residues of the Tobacco Etch Virus 49 kDa Proteinase". Virology. vol. 172, no. 1, p. 302-310.
- DUNNE, H. W., J. C. Gobble, J. R. Hokanson, D. C. Kradel, G. R. Bubash. 1965. "Porcine Reproductive Failure Associated with a Newly Defined 'SMEDI' Group of Picornavirus." American Journal of Veterinary Research. vol. 26, no. 115, p. 1284-1290.
- ELSBACH, Peter, Jerrold Weiss, Richard C. Franson, Susan Beckerdite-Quagliata, Aviva Schneider, Lesley Harris. 1979. "Separation and Purification of a Potent Bactericidal/Permeability-increasing Protein and a Closely Associated Phospholipase A<sub>2</sub> from Rabbit Polymorphonuclear Leukocytes". The Journal of Biological Chemistry. vol. 254, no. 21, p. 11000-11009.

- GINSBERG, J. S., P. S. Wells, P. Brill-Edwards, D. Donovan, K. Moffatt, M. Johnston, P. Stevens, J. Hirsh. 1995. "Antiphospholipids Antibodies and Venous Thromboembolism". Blood. vol. 86, no. 10, p. 3685-3691.
- GLASER, Keith B., Robert S. Jacobs. 1987. "Inactivation of Bee Venom Phospholipase A<sub>2</sub> by Manoalide. A Model Based on the Reactivity of Manoalide with Amino Acids and Peptide Sequences". Biochemical Pharmacology. vol. 36, no. 13, p. 2079-2086.
- GRATACOS, E., P. J. Torres, J. Vidal, J. Font, E. Antolin, V. Cararach, A. Fortuny. 1995. "Prevalence and Clinical Significance of Anticardiolipine Antibodies in Pregnancies Complicated by Parvovirus B19 Infection". Prenatal Diagnosis. vol. 15, p. 1109-1113.
- GROSCH, Hans-Wilhelm. 1998 "Protection of Proteolysis-Prone Recombinant Proteins in Baculovirus Expression Systems". Biotechniques. vol. 24, no. 6, p. 930-934.
- HOPE, W. C., T. Chen, D. W. Morgan. 1993. "Secretory Phospholipase A<sub>2</sub> Inhibitors and Calmodulin Antagonists as Inhibitors of Cytosolic Phospholipase A<sub>2</sub>". Agents Actions. vol. 39, numéro spécial, p. C39-42.
- JACOBSON, Peer B., Lisa A Marshall, Amy Sung, Robert S. Jacobs. 1990. "Inactivation of Human Synovial Fluid Phospholipase A<sub>2</sub> by the Marine Natural Product, Manoalide". Biochemical Pharmacology. vol. 39, no. 10, p. 1557-1564.
- JACOBY, Robert O., Lisa J. Ball-Goodrich, David G. Besselsen, Maureen D. McKisic, Lela K. Riley, Abigail L. Smith. 1996. "Rodent Parvovirus Infections". Laboratory Animal Sciences. vol. 46, p. 370-380.
- KENNEDY, Brian P., Paul Payette, John Mudgett, Peter Vadas, Waldemar Pruzanski, Mei Kwan, Clementine Tang, Derrick E. Rancourt, Wanda A. Cromlish. 1995. "A Natural Disruption of the Secretory Group II Phospholipase A<sub>2</sub> Gene in Inbred Mouse Strains". The Journal of Biological Chemistry. vol. 270, no. 38, p. 22378-22385.

- LAMBEAU, Gérard, P. Ancian, J.-P. Nicolas, S. H. W. Beiboer, D. Moinier, H. Verheij, M. Lazdunski. 1995. "Structural Elements of Secretory Phospholipase A<sub>2</sub> Involved in the Binding to M-type Receptors". The Journal of Biological Chemistry. vol. 270, no. 10, p. 5534-5540.
- LI, Yi, Françoise-Xavière Jousset, Catherine Giraud, Fabienne Rolling, Jean-Marie Quiot, Max Bergoin. 1996. "A Titration Procedure of the *Junonia coenia* Densovirus and Quantitation of Transfection by Its Cloned Genomic DNA in Four Lepidopteran Cell Lines". Journal of Virological Methods. vol. 57, p. 47-60.
- LI, Yishan, Bao-Zhu Yu, Hongxin Zhu, Mahendra K. Jain, Ming-Daw Tsai. 1994. "Phospholipase A<sub>2</sub> Engineering. Structural and Functional Roles of the Highly Conserved Active Site Residue Aspartate-49". Biochemistry. vol. 33, no. 49, p. 14714-14722.
- LOMBARDO, D., E. A. Dennis. 1985. "Cobra Venom Phospholipase A<sub>2</sub> Inhibition by Manoalide. A Novel Type of Phospholipase Inhibitors". Journal of Biological Chemistry. vol. 260, no. 12, p. 7234-7240.
- LOMBARDO, D., E. A. Dennis. 1985. "Immobilized Phospholipase A<sub>2</sub> from Cobra Venom. Prevention of Substrate Interfacial and Activator Effects". Journal of Biological Chemistry. vol. 260. no. 30, p. 16114-16121.
- LUNARDI, Claudio, Micaela Tiso, Lorena Borgato, Luca Nanni, Romano Millo, Giorgio De Sandre, Antonio Bargellesi Severi, Antonio Puccetti. 1998. "Chronic Parvovirus B19 Infection Induces the Production of Anti-Virus Antibodies with Autoantigen Binding Properties". European Journal of Immunology. vol. 28, p. 936-948.
- MADSEN, Eva Smedegaard, Knud Gert Madsen, Jens Nielsen, Merethe Holm Jensen, Jorgen Christian Lei, Per Have. 1997. "Detection of Antibodies Against Porcine Parvovirus Nonstructural Protein NS1 May Distinguish between Vaccinated and Infected Pigs". Veterinary Microbiology. vol. 54, p. 1-16.
- MENGELING, W. L. 1986. "Porcine Parvovirus Infection". Dans Diseases of Swine, Sixth Edition. section 3, chap. 35. (A. D. Leman *et al.* ed.) Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, p. 411-424.

- MEREDITH, Michael, Procine Parvovirus, Pig Disease Information Centre, 1997, p. 1-3, [http://www-pdic.vet.cam.ac.uk/Dis\\_Info/parvovirus.html](http://www-pdic.vet.cam.ac.uk/Dis_Info/parvovirus.html)
- MOFFATT, S., N. Yaegashi, K. Tada, N. Tanaka, K. Sugamura. 1998. "Human Parvovirus B19 Nonstructural (NS1) Protein Induces Apoptosis in Erythroid Lineage Cells". Journal of Virology. vol. 72, no. 4, p. 3018-3028.
- MOFFATT, S., N. Tanaka, K. Tada, M. Nose, M. Nakamura, O. Muraoka, T. Hirano, K. Sugamura. 1996. "A Cytotoxic Nonstructural Protein, NS1, of Human Parvovirus B19 Induces Activation of Interleukin-6 Gene Expression". Journal of Virology. vol. 70, p. 8485-8491.
- MOLITOR, Thomas W., Han S. Joo. 1990. "Clinical and Pathological Features of Porcine-Parvoviruses-Related Disease and its Diagnosis". Dans Handbook of Parvoviruses. vol. II, chap. 9, p. 135-149. (Tijssen, P., ed.) CRC Press, Boca Raton, FL.
- MOLITOR, Thomas W., Han S. Joo, Marc S. Collett. 1985. "Identification and Characterization of a Porcine Parvovirus Nonstructural Polypeptide". Journal of Virology. vol. 55, p. 554-559.
- MOLITOR, Thomas W., Han S. Joo, Marc S. Collett. 1985. "KBSH Parvovirus: Comparison with Porcine Parvovirus". Journal of Virology. vol. 55, p. 257-263.
- NAEGER, Lisa Kay, Nathalie Salomé, David J. Pintel. 1993. "NS2 Is Required for Efficient Translation of Viral mRNA in Minute Virus of Mice-Infected Murine Cells". Journal of Virology. vol. 67, p. 1034-1043.
- NAIDES, Stanley J. 1998. "Rheumatic Manifestations of Parvovirus B19 Infection". Rheumatic Disease Clinics of North America. vol. 24, no. 2, p. 375-401.
- NÜESCH, Jurg P. F., Peter Tattersall. 1993. "Nuclear Targeting of the Parvoviral Replicator Molecule NS1: Evidence for Self-Association Prior to Nuclear Transport". Virology. vol. 196, p. 637-651.



- NÜESCH, Jurg P. F., Susan F. Cotmore, Peter Tattersall. 1995. "Sequence Motifs in the Replicator Protein of Parvovirus MVM Essential for Nicking and Covalent Attachment to the Viral Origin: Identification of the Linking Tyrosine". Virology. vol. 209, no. 1, p. 122-135.
- OLEKSIWICZ, Martin B., Fred Costell, Mark Huhtanen, James B. Wolfenbarger, Soren Alexandersen, Marshall E. Bloom. 1996. "Subcellular Localization of Aleutian Mink Disease Parvovirus Proteins and DNA during Permissive Infection of Crandell Feline Kidney Cells". Journal of Virology. vol. 70, p. 3242-3247.
- ORAVEERAKUL, Kanisak, Chang-Soo Choi, Thomas W. Molitor. 1992. "Restriction of Porcine Parvovirus Replication in Nonpermissive Cells". Journal of Virology. vol. 66, p. 715-722.
- ORAVEERAKUL, Kanisak, Chang-Soo Choi, Thomas W. Molitor. 1993. "Tissue Tropisms of Porcine Parvovirus in Swine". Archives of Virology. vol.130, p. 377-389.
- PARRISH, Colin R. 1995. "Introduction: Autonomous Animal Parvoviruses". Seminars in Virology. vol. 6, p. 269-270.
- PATRIARCA, P., S. Beckerdite, P. Elsbach. 1972. "Phospholipases and Phospholipid Turnover in *Escherichia coli* Spheroplasts". Biochimica Et Biophysica Acta. vol. 260, p. 593-600.
- PELLERIN, Charles, Jan van den Hurk, Jaqueline Lecomte, Peter Tijssen. 1994. "Identification of a New Group of Bovine Viral Diarrhea Virus Strains Associated with Severe Outbreaks and High Mortalities". Virology, vol. 203, p. 260-268.
- PETERS, R., 1986. "Fluorescence microphotolysis to measure nucleocytoplasmic transport and intracellular mobility". Biochimica Biophysica Acta. vol. 864, p. 305-359.
- POBLOTZKI, Andreas von, Andrea Hemauer, Andreas Gigler, Elisabeth Puchhammer-Stöckl, Franz Xaver Pont, Jörg Laczika, Hans Wolf, Susanne Modrow. 1995. "Antibodies to the Nonstructural Protein of Parvovirus B19 in Persistently Infected Patients: Implication for Pathogenesis". The Journal of Infectious Diseases. vol. 172, p. 1356-1359.

- PRUZANSKI, W., P. Vadas. 1991. "Phospholipase A<sub>2</sub> – a Mediator Between Proximal and Distal Effectors of Inflammation". Immunology Today. vol. 12, no. 5, p. 143-146.
- RENETSEDER, Roland, Simone Brunie, Bauke W. Dijkstra, Jan Drenth, Paul B. Sigler. 1985. "A Comparison of the Crystal Structures of Phospholipase A<sub>2</sub> from Bovine Pancreas and *Crotalus atrox* Venom". The Journal of Biological Chemistry. vol. 260, no. 21, p. 11627-11634.
- REYNOLDS, Laure J., Lori L. Hughes, Edward A. Dennis. 1992. "Analysis of Human Synovial Fluid Phospholipase A<sub>2</sub> on Short Chain Phosphatidylcholine-Mixed Micelles: Development of a Spectrophotometric Assay". Analytical Biochemistry. vol. 204, p.190-197.
- REYNOLDS, Laure J., William N. Washburn, Raymond A. Deems, Edward A. Dennis. 1991. "Assay Strategies and Methods for Phospholipases". Methods in Enzymology. vol. 197, p. 3-23.
- ROBERTS, Mary Fedarko, Raymond A. Deems, Terry C. Mincey, Edward A. Dennis. 1977. "Chemical Modification of the Histidine Residue in Phospholipase A<sub>2</sub> (*Naja naja naja*)". The Journal of Biological Chemistry. vol. 252, no. 7, p. 2405-2411.
- ROCK, Kenneth L., Colette Gramm, Lisa Rothstein, Karen Clark, Ross Stein, Lawrence Dick, Daniel Hwang, Alfred L. Goldberg. 1994. "Inhibitors of the Proteasome Block the Degradation of Most Cell Proteins and the Generation of Peptides Presented on MHC Class 1 Molecules". Cell. vol. 78, no. 5, p. 761-771.
- RUSTENBECK, Ingo, Wilfried Münster, Sigurd Lenzen. 1996. "Relation between Accumulation of Phospholipase A<sub>2</sub> Reaction Products and Ca<sup>2+</sup> Release in Isolated Liver Mitochondria". Biochimica et Biophysica Acta. vol. 1304. p. 129-138.
- SAMBROOK, J., E. F. Fritsch, T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, p.18.31
- SCHORER, Anna E., Peter G. Duane, Virgil L. Woods, Dennis E. Niewoehner. 1992. "Some Antiphospholipid Antibodies Inhibit Phospholipase A<sub>2</sub> Activity". Journal of Laboratory and Clinical Medicine. vol. 120, p. 67-77.

- SCOTT, David L., Steven P. White, Jeffrey L. Browning, Joseph J. Rosa, Michael H. Gelb, Paul B. Sigler. 1991. "Structures of Free and Inhibited Human Secretory Phospholipase A<sub>2</sub> from Inflammatory Exudate". Science. vol. 254, p. 1007-1010.
- SCOTT, David L., Zbyszek Otwinowski, Michael H. Gelb, Paul B. Sigler. 1990. "Crystal Structure of Bee-Venom Phospholipase A<sub>2</sub> in Complex with a Transition-State Analogue". Science. vol. 250, p. 1563-1566.
- SEKAR, Kanagaraj, Bao-Zhu Yu, Joseph Rogers, John Lutton, Xiaohong Liu, Xin Chen, Ming-Daw Tsai, Mahendra K. Jain, Muttaiya Sundaralingam. 1997. "Phospholipase A<sub>2</sub> Engineering. Structural and Functional Roles of the Highly Conserved Active Site Residue Aspartate-99". Biochemistry. vol. 36, no. 11, p. 3104-3114.
- SHERWOOD, Steven W., Andrew L. Kung, Joseph Roitelman, Robert D. Somini, Robert T. Schimke. 1993. "In Vivo Inhibition of Cyclin B Degradation and Induction of Cell-cycle Arrest in Mammalian Cells by the Neutral Cysteine Protease Inhibitor N-acetylleucylleucylnorleucinal". Proceedings of the National Academy of Science USA. vol. 90, p. 3353-3357.
- SKIADOPOULOS, Mario H., Ralph Salvino, Liang Leong Wey, Emmanuel A. Faust. 1992. "Characterization of Linker Insertion and Point Mutations in the NS1 Gene of Minute Virus of Mice: Effects on DNA Replication and Transcriptional Activation Functions of NS1". Virology. vol. 188, p. 122-134.
- SMITH, Duane M., Moseley Waite. 1992. "Phosphatidylinositol Hydrolysis by Phospholipase A<sub>2</sub> and C Activities in Human Peripheral Blood Neutrophils". Journal of Leukocyte Biology. vol. 52, p. 670-678.
- STOLZE, Birgit, Oskar-Rüger Kaaden. 1987. "Apparent Lack of Neutralizing Antibodies in Aleutian Disease Is Due to Masking of Antigenic Sites by Phospholipids". Virology. vol. 158, p. 174-180.
- STRATTA, P., C. Canavese, S. Ferrero, A. Grill, G. Piccoli. 1997. "Guidelines for Looking at the Antiphospholipid Antibodies in Systemic Lupus Erythematosus". Nephron. vol. 76, p. 400-405.

- TAM, Patrick, Caroline R. Astell. 1993. "Replication of Minute Virus of Mice Minigenomes: Novel Replication Elements Required for MVM DNA Replication". Virology. vol. 193, p. 812-824.
- TATTERSALL, Peter, Jürg P. F. Nüesch. 1993. "Nuclear Targeting of the Parvoviral Replicator Molecule NS1: Evidence for Self-Association Prior to Nuclear Transport". Virology. vol. 196, p. 637-651.
- TIJSSEN, Peter. 1990. "Introduction: Parvoviruses". Dans Handbook of Parvoviruses. vol. I, chap. 1. (Tijssen, P., ed.) CRC Press, Boca Raton, FL, p. 3-11.
- TIJSSEN, Peter, Jean Bergeron. 1994. "Parvoviruses: Rodents, Pigs, Cattle and Geese". Dans Encyclopedia of Virology. Academic Press, San Diego, CA. p. 1067-1075.
- TIJSSEN, Peter, Jean Bergeron, Roger Dubuc, Benoît Hébert. 1995. "Minor Genetic Changes Among Porcine Parvovirus Groups Are Responsible for Major Distinguishing Biological Properties". Seminars in Virology. vol. 6, p. 319-328.
- TIJSSEN, Peter, Max Bergoin. 1995. "Densonucleosis Viruses Constitute an Increasingly Diversified Subfamily Among the Parvoviruses". Seminars in Virology. vol. 6, p. 347-355.
- TISCHFIELD, Jay A. 1997. "A Reassessment of the Low Molecular Weight Phospholipase A<sub>2</sub> Gene Family in Mammals". The Journal of Biological Chemistry. vol. 272, no. 28, p. 17247-17250.
- TRIPLETT, Douglas A.. 1992. "Antiphospholipid Antibodies: Proposed Mechanisms of Action". American Journal of Reproductive Immunology. vol. 28, p. 211-215.
- TSENG, Albert, Adam S. Inglis, Kieran F. Scott. 1996. "Native Peptide Inhibition". The Journal of Biological Chemistry. vol. 271, no. 39, p. 23992-23998.
- VANACKER, Jean-Marc, Jean Rommelaere. 1995. "Nonstructural Proteins of Autonomous Parvoviruses: from Cellular effects to molecular mechanisms, Seminars in Virology. vol. 6, p. 291-297.

VOET, Donald, Judith G. Voet. 1995. "Lipid Metabolism". Dans Biochemistry 2<sup>nd</sup> edition. chap. 23, p. 662-666. John Wiley and Sons, Inc., New York, USA..

WALKER, Scotty L., Ramani S. Wonderling, Roland A. Owens. 1997. "Mutational Analysis of the Adeno-Associated Virus Rep68 Protein: Identification of Critical Residues Necessary for Site-Specific Endonuclease Activity". Journal of Virology. vol. 71, p. 2722-2730.

WHITE, Steven P., David L. Scott, Zbyszek Otwinowski, Michael H. Gelb, Paul B. Sigler. 1990. "Crystal Structure of Cobra-Venom Phospholipase A<sub>2</sub> in a Complex with a Transition-State Analogue". Science. vol. 250, p. 1560-1563.

WILSON, Gary M., Hitesh K. Jindal, Dougl's E. Yeung, Wei Chen, Caroline R. Astell. 1991. "Expression of Minute Virus of Mice Major Nonstructurale Protein in Insect Cells: Purification and Identification of ATPase and Helicase Activities". Virology. vol. 185, p. 90-98.

YU, Lin, Raymond A. Deems, Joseph Hajdu, Edward A. Dennis. 1990. "The Interaction of Phospholipase A<sub>2</sub> with Phospholipid Analogues and Inhibitors". The Journal of Biological Chemistry. vol. 265, no. 5, p. 2657-2664.

ZADORI, Zoltan, Jozsef Szelei, Marie-Claude Lacoste, Marc Allaire, Yi Li, Sébastien Gariépy, Philippe Raymond, Peter Tijssen. 2000. "Novel Phospholipase A<sub>2</sub> Activity in Virus Capsids". soumis à Science.

ZHU, Hongxin, Cynthia M. Dupureur, Xiaoyan Zhang, Ming-Daw Tsai. 1995. "Phospholipase A<sub>2</sub> Engineering. The Roles of Disulfide Bonds in Structure, Conformational Stability, and Catalytic Function". Biochemistry. vol. 34, no. 46, p. 15307-15314.

