

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**« *Structure et fonction de la partie unique
de la protéine VP1 du parvovirus porcine* »**

Par

Véronique Bouchard-Lévesque

Mémoire

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

Dr. Peter Tijssen, Directeur de recherche; INRS-IAF

Décembre 2011

RÉSUMÉ

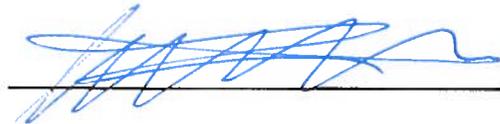
Le parvovirus porcin (PPV) possède une capsid de symétrie icosaédrale, avec une lattice de triangulation (T) égale à un, formée des protéines VP1 (84 kDa) et VP2 (64 kDa). La séquence de VP1 est identique à celle de VP2 à l'exception d'une extension de 150 acides aminés (aa) en N-terminal. Cette partie unique de VP1 (VP1up) est cruciale pour l'infectivité, notamment en raison de la présence d'un motif phospholipase A₂ (pvPLA₂) assurant une fonction capitale dans les étapes précoces du cycle viral. En raison de l'importance de la pvPLA₂ dans le cycle viral et de l'existence de nombreuses différences la distinguant des PLA₂ sécrétées (sPLA₂), nous souhaitons obtenir sa structure tridimensionnelle par résonance magnétique nucléaire (RMN). Cette technique s'imposait puisque notre laboratoire a été incapable antérieurement de visualiser VP1up par cristallographie. Au préalable, étant donné la toxicité de VP1up conférée par l'activité pvPLA₂, nous avons dû optimiser son expression et sa purification. Nous avons obtenu des taux de pureté et des rendements de production de VP1up excellents, 99% et 4 mg de protéine purifiée/litre de culture respectivement. Toutefois, les essais de RMN ont été infructueux. L'instabilité de cette région, due à l'absence de ponts disulfures, pourrait expliquer les difficultés encourues. Ainsi, l'insertion de cystéines, dans des endroits stratégiques pourrait possiblement faciliter l'élucidation de la structure de ce domaine enzymatique.

Aussi, VP1up possède cinq régions basiques correspondant potentiellement à des signaux de localisation nucléaire (NLS), ici appelées BR1 (aa 3 à 9), BR2 (aa 86 à 89), BR3 (aa 110 à 116), BR4 (aa 120 à 130) et BR5 (aa 137 à 141), pouvant également contribuer à son importance dans l'infectivité. Ces régions pourraient être essentielles pour la translocation nucléaire précoce de la capsid et tardive des trimères de VP1/VP2. Des protéines recombinantes contenant VP1up dépourvue de son activité pvPLA₂ (mutant HD⁻) fusionnée à la protéine fluorescente mCherry ont été générées dans un vecteur d'expression. Puis, des expériences de mutagenèse dirigée dans les BRs et de microscopie à fluorescence ont permis de démontrer que les BR4 et BR5 forment un NLS bipartite et que VP1up possède deux NLSs fonctionnels majeurs, BR1 et BR4-

BR5. Les mutations BR1 et BR1/BR4/BR5 ont été transférées dans un clone infectieux du PPV afin de mieux comprendre les rôles de ces NLSs dans le cycle viral. Leur importance dans l'infectivité et dans les étapes tardives d'infection a été évaluée grâce à des titrages et par PCR quantitatif, respectivement. Ces résultats révèlent qu'ils sont cruciaux pour les étapes précoces du cycle viral. Finalement, nous avons démontré que VP1_{up} se localise naturellement à l'intérieur du nucléole. Aussi, nous avons débuté la détermination des rôles des BRs dans sa localisation nucléolaire et d'interactions VP1_{up}-protéines nucléolaires. Les résultats préliminaires suggèrent fortement que certaines BRs possèdent une activité de transport nucléolaire et que VP1_{up} interagit avec la protéine nucléophosmine/B23 via la BR4. L'importance des interactions entre le virus et le nucléole reste à déterminer. En conclusion, ces expériences ont mis en lumière les fonctions multiples de VP1 et permettront une meilleure compréhension de ses rôles dans l'infection.



Véronique Bouchard-Lévesque



Dr. Peter Tijssen, Directeur de recherche

Table des Matières

Table des matières	v
Liste des figures	viii
Liste des tableaux	ix
Liste des abréviations	x
Remerciements	xi
Introduction	1
Revue de littérature	5
1 Généralités du parvovirus porcin	6
1.1 Découverte	6
1.2 Taxonomie	6
1.3 Transmission et virémie	7
1.4 Tropisme	8
1.5 Souches et pathogénie	9
1.6 Propriétés physiques	10
2 Cycle de réplication des parvovirus	11
2.1 Étapes précoces	11
2.2 Étapes intermédiaires	13
2.3 Étapes tardives	14
3 Composantes des parvovirus	15
3.1 Génome	15
3.1.1 Structure et organisation	15
3.1.2 Profil de transcription	16
3.2 Capside	21
3.2.1 Caractéristiques	21
3.2.2 Structure secondaire, tertiaire et quaternaire	21
3.2.3 Axes de symétrie	22
3.2.4 Assemblage	23
3.3 Protéines	26
3.3.1 Non-structurales	26
3.3.2 Structurales	29
4 Phospholipase A ₂	34
4.1 Rôles	34
4.2 Classification	34
4.3 Liaison du substrat	35
4.4 Réaction enzymatique	35
4.5 Acides aminés importants du site actif	36
4.6 Phospholipase A ₂ virale	39
4.6.1 Principe de la résonance magnétique nucléaire	43
5 Signaux de localisation nucléaire	46
5.1 Rôle	46
5.2 Voie classique d'importation nucléaire	46
5.3 Types	47

5.3.1	Classiques.....	47
5.3.2	Non-classiques.....	47
5.4	Signaux de localisation nucléaire de VP1up.....	48
Méthodologie.....		52
1	Techniques générales.....	53
1.1	Précipitation à l'éthanol de l'ADN.....	53
1.2	Électrophorèses.....	53
1.2.1	Électrophorèse sur gel d'agarose.....	53
1.2.2	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes.....	54
1.3	Transformation bactérienne.....	56
1.4	Extraction d'ADN.....	57
1.4.1	Mini-préparation d'ADN.....	57
1.4.2	Midi-préparation d'ADN.....	58
1.5	Sélection des clones par digestion enzymatique.....	60
1.6	Séquençage et conservation des clones/mutants.....	60
1.7	Mutagenèse dirigée.....	61
1.8	Culture cellulaire.....	62
1.8.1	Passage des cellules PT.....	62
1.8.2	Transfection des cellules PT.....	62
1.8.3	Immunofluorescence indirecte.....	63
2	Protocoles section activité phospholipase A ₂ sécrétée de VP1up.....	64
2.1	Clonage de VP1M33 dans le vecteur d'expression pPAL7.....	64
2.1.1	Description de l'insert et du vecteur.....	64
2.1.2	Optimisation de la séquence de VP1M33.....	65
2.1.3	Amplification de l'insert.....	70
2.1.4	Préparation de l'insert et du vecteur.....	71
2.1.5	Ligation et validation du clonage.....	71
2.2	Expression de la protéine de fusion.....	72
2.3	Lyse cellulaire et solubilité de la protéine de fusion.....	72
2.4	Pré-purification de la protéine de fusion.....	73
2.5	Purification de VP1M33.....	74
2.6	Conservation de VP1M33.....	75
2.7	Dosage de VP1M33.....	76
2.8	Essais de résonance magnétique nucléaire.....	77
3	Protocoles section régions basiques de VP1up.....	77
3.1	Clonage de VP1GS dans le vecteur intermédiaire pBluescript KS+.....	77
3.1.1	Description de l'insert et du vecteur.....	77
3.1.2	Amplification de l'insert.....	77
3.1.3	Préparation de l'insert et du vecteur.....	78
3.1.4	Ligation et validation du clonage.....	78
3.2	Clonage de mCherry dans le vecteur d'expression pcDNA3.1+.....	79
3.2.1	Description de l'insert et du vecteur.....	79
3.2.2	Amplification de l'insert.....	79
3.2.3	Préparation de l'insert et du vecteur.....	80
3.2.4	Ligation et validation du clonage.....	80

3.3	Inactivation des régions basiques de VP1up	81
3.4	Transfert des mutants VP1GS dans le vecteur d'expression recombinant pcDNA3.1+-mCherry	83
3.4.1	Préparation de l'insert et du vecteur	83
3.4.2	Ligation et validation du clonage	83
3.5	Analyse de la distribution intracellulaire des mutants VP1GS	84
3.6	Analyse de la co-localisation de mutants VP1GS et de la protéine nucléolaire nucléoplasmine/B23	85
3.7	Transfert de mutants VP1GS dans le clone infectieux du PPV pNO NADL-2	86
3.7.1	Stratégie de clonage	86
3.7.2	Inactivation des sites PvuII et PstI	87
3.7.3	Clonage de l'extension 5'	89
3.7.4	Réinsertion de la mutation BR1	90
3.7.5	Clonage de l'extension 3'	90
3.7.6	Clonage du fragment contenant la mutation BR1	93
3.7.7	Clonage du fragment contenant les mutations BR1/BR4/BR5	94
3.8	Analyse de l'infectivité des mutants du PPV	95
3.9	Analyse de la production virale pour les mutants du PPV	97
3.9.1	Immunoprécipitation des capsides	97
3.9.2	PCR quantitatif des génomes viraux encapsidés	97
	Résultats	99
1	Activité phospholipase A ₂ sécrétée de VP1up	100
1.1	Structure tridimensionnelle du domaine phospholipase A ₂ de VP1up	100
2	Régions basiques de VP1up	107
2.1	Activité de transport nucléaire des régions basiques de VP1up	107
2.2	Interactions nucléolaires de VP1 et rôles des régions basiques de VP1up	114
2.3	Rôles dans le cycle viral des régions basiques de VP1up	121
	Discussion	127
1	Activité phospholipase A ₂ sécrétée de VP1up	128
1.1	L'instabilité de la VP1up nuit aux études structurales	128
2	Régions basiques de VP1up	130
2.1	VP1up possède deux NLSs majeurs	130
2.2	VP1up interagit avec le nucléole	133
2.3	Les NLSs sont cruciaux au niveau des étapes précoces d'infection	134
	Conclusion	137
	Communications scientifiques	141
	Bibliographie	149

Liste des Figures

Figure 1 : Génome du PPV	19
Figure 2 : Capside des parvovirus	24
Figure 3 : Protéines structurales du PPV	32
Figure 4 : Activité phospholipase A ₂	37
Figure 5 : Alignement de séquences de motifs PLA ₂ s de parvovirus et de sPLA ₂ s représentatives	41
Figure 6 : Régions basiques de la VP1up du PPV	50
Figure 7 : Gène VP1M33	66
Figure 8 : Système de purification de protéines Profinity eXact™ de Bio-Rad....	68
Figure 9 : Analyse SDS-PAGE de la solubilité de la protéine de fusion.....	103
Figure 10 : Analyse SDS-PAGE de VP1M33 purifiée	105
Figure 11 : Activité de transport nucléaire des régions basiques de VP1up	110
Figure 12 : Localisation nucléolaire de VP1up et activité de transport nucléolaire de ses régions basiques	115
Figure 13 : Interaction de VP1up avec la protéine nucléolaire nucléophosmine/ B23 et implication de ses régions basiques	119
Figure 14 : Importance des NLSs de VP1up dans l'infectivité	122
Figure 15 : Importance des NLSs de VP1up dans les étapes tardives d'infection	125

Liste des Tableaux

Tableau I : Amorces pour le clonage et le séquençage de VP1M33 dans le vecteur d'expression pPAL7	70
Tableau II : Amorces pour le clonage de VP1GSHD ^r dans le vecteur intermédiaire pBluescript KS+.....	78
Tableau III : Amorce pour le séquençage de gènes clonés dans le MCS du vecteur intermédiaire pBluescript KS+	79
Tableau IV : Amorces pour le clonage de mCherry dans le vecteur d'expression pcDNA3.1+	80
Tableau V : Amorce pour le séquençage de gènes clonés dans le MCS du vecteur d'expression pcDNA3.1+.....	81
Tableau VI : Amorces pour la mutagenèse dirigée dans les régions basiques de VP1up	82
Tableau VII : Amorces pour la mutagenèse dirigée dans les sites PvuII et PstI du vecteur intermédiaire pBluescript KS+	88
Tableau VIII : Amorces pour le clonage de l'extension 5' dans le vecteur intermédiaire pBluescriptKS+ PvuII ^r /PstI ^r contenant VP1GSBR1/BR4/BR5.....	89
Tableau IX : Amorces pour le clonage de l'extension 3' dans le vecteur intermédiaire pBluescriptKS+ PvuII ^r /PstI ^r contenant (ext5')VP1GSBR1/BR4/BR5	91
Tableau X : Amorce pour le séquençage de la région en aval de la position 2525 du génome viral	93
Tableau XI : Amorce pour le séquençage de la région en aval de la position 1770 du génome viral	94
Tableau XII : Amorces pour déterminer le nombre de copies de génome du PPV par PCR quantitatif.....	98

Liste des Abréviations

°C:	Degré Celsius
2Nt :	Région N-terminal de VP2
3D :	Tridimensionnelle
Å :	Ångstrom
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AMDV :	<i>Aleutian mink disease virus</i>
ARNm :	Acide ribonucléique
B19 :	Parvovirus humain B19
BC :	Groupement basique
BPV-1 :	Parvovirus Bovin type 1
BR :	Région basique
CnMV :	<i>Canine minute virus</i>
CPV :	Parvovirus canin
FPV :	Virus de la panleucopénie féline
IPTG :	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
kDa :	Kilodalton
MCS :	Site de clonage multiple
mRF :	Forme monomérique répliquative
MVM :	Parvovirus murin
NLM :	Motif de localisation nucléaire
NLS :	Signal de localisation nucléaire
NoLS :	Signal de localisation nucléolaire
NPC :	Complexe du pore nucléaire
NS :	Protéine non-structurale
ORF :	Cadre de lecture ouvert
PCR :	Réaction de polymérisation en chaîne
PLA ₂ :	Phospholipase A ₂
PPV :	Parvovirus porcine
PT :	Fibroblastes de testicule de porcs
pvPLA ₂ :	Phospholipase A ₂ parvovirale
qPCR :	PCR quantitatif
SAT:	<i>Small alternatively translated protein</i>
sn-2 :	Position 2 du lien ester
sPLA ₂ :	Phospholipase A ₂ sécrétée
SV40 :	Virus simien 40
tRNA :	ARN de transfert
VP :	Protéine structurale
VP1up :	Partie unique de VP1

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, j'aimerais spécialement remercier mon directeur de recherche, Dr. Peter Tijssen, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire ainsi que pour son soutien, sa grande générosité et son aide précieuse tout au long de mes études de maîtrise.

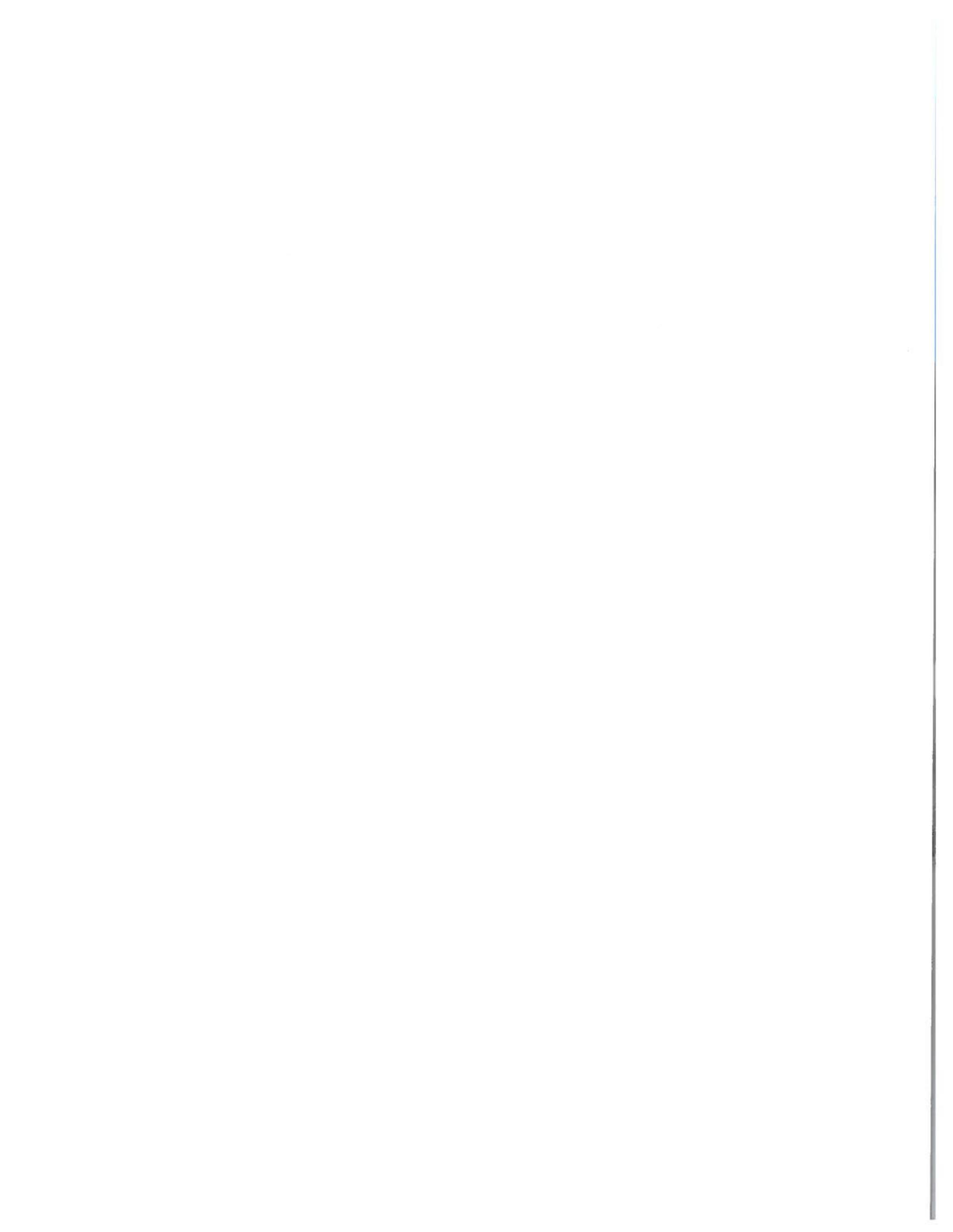
Je souhaite également remercier tous les membres du laboratoire, anciens et présents, particulièrement Sandra Fernandes et Maude Boisvert. Merci Sandra pour tous tes enseignements, ton support dans les moments difficiles et pour m'avoir aussi bien guidé et encadré durant mon projet. Merci à toi Maude pour ta collaboration dans ce projet ainsi que pour l'aide que tu m'as apporté et les moments de réflexions que tu m'as accordé lorsque mon travail stagnait. Je vous souhaite la meilleure des chances dans la poursuite de vos études.

Aussi, j'aimerais exprimer ma gratitude à mes parents pour m'avoir épaulé, soutenu, conseillé et pour votre compréhension. Merci également pour votre amour qui m'a permis d'avancer même dans les périodes les plus difficiles. Un énorme merci à mon frère jumeau, Simon, qui est mon guide spirituel. Tu m'as énormément appris sur la vie et tu m'as aidé à mieux me comprendre. Ton soutien a été d'une grande importance pour moi et grâce à toi, je suis maintenant une personne plus forte. Je vous aime, sans vous trois rien de tout cela n'aurait été possible.

Merci à toi Michael, tu as été là durant toutes ces années, tu m'as aidé, réconforté, appuyé, encouragé et surtout, tu as enduré ma mauvaise humeur dans les moments de grands stress! Pour tout cela, je te souhaite la meilleure des chances dans le futur et tout le bonheur du monde. Je t'aime, tu resteras à jamais gravé dans mes pensées et dans mon cœur.

Finalement, je remercie le Dr. Kalle Gehring pour le travail effectué en RMN ainsi que la fondation Armand-Frappier pour m'avoir octroyé des bourses qui m'ont permis financièrement de réaliser ce projet.

INTRODUCTION



La famille des *Parvoviridae* se divise en deux sous-familles, l'une qui infecte les invertébrés, soit les *Densovirinae* et l'autre, les *Parvovirinae*, qui infectent plutôt les vertébrés. La sous-famille des *Parvovirinae* regroupe plusieurs genres: les *Amdovirus*, les *Erythrovirus* qui infectent principalement les enfants, causant la 5ème maladie, les *Dependovirus*, les *Bocavirus* et finalement, les *Parvovirus*. Ces derniers comprennent entre autres les parvovirus canin (CPV), le type infectant les rongeurs (MVM) et le parvovirus porcine (PPV). Le PPV fait des ravages dans les troupeaux de porcs partout sur la planète en étant responsable du syndrome de SMEDI (Stillbirth, Mummified, Embryonic Death and Infertility). En effet, il cause des problèmes de reproduction chez cette espèce, en particulier grâce à sa capacité à passer la barrière placentaire, lui permettant d'infecter les fœtus, résultant en des avortements, de la momification ou des porcelets morts nés. Ainsi, il est responsable de pertes économiques considérables chez les éleveurs. De plus, en ce qui concerne l'homme, le PPV est d'intérêt puisque des produits porcins sont présentement utilisés en clinique chez l'homme, comme l'enzyme pancréatique, et éventuellement lors de xénogreffes. L'homme peut donc être en contact avec ce virus. Jusqu'à aujourd'hui, aucun cas d'infection chez l'humain n'est répertorié. Toutefois, un saut d'espèce pourrait se produire puisque ce phénomène a déjà été observé lorsque le parvovirus félin s'est adapté pour également infecter les chiens, causant une importante pandémie canine à la fin des années 70.

La réplication du PPV se déroule dans le noyau de la cellule infectée. En effet, il doit utiliser la machinerie cellulaire étant donné sa capacité codante limitée. De plus, il doit attendre la phase S du cycle cellulaire, puisque lui-même ne peut l'induire. Il infecte donc principalement les cellules en division active chez l'hôte, ce qui résulte en la lyse de celles-ci. Quant au transport intracellulaire, il a lieu de façon active en empruntant, tout d'abord, la voie endosomale puis les réseaux de microtubules et d'actines.

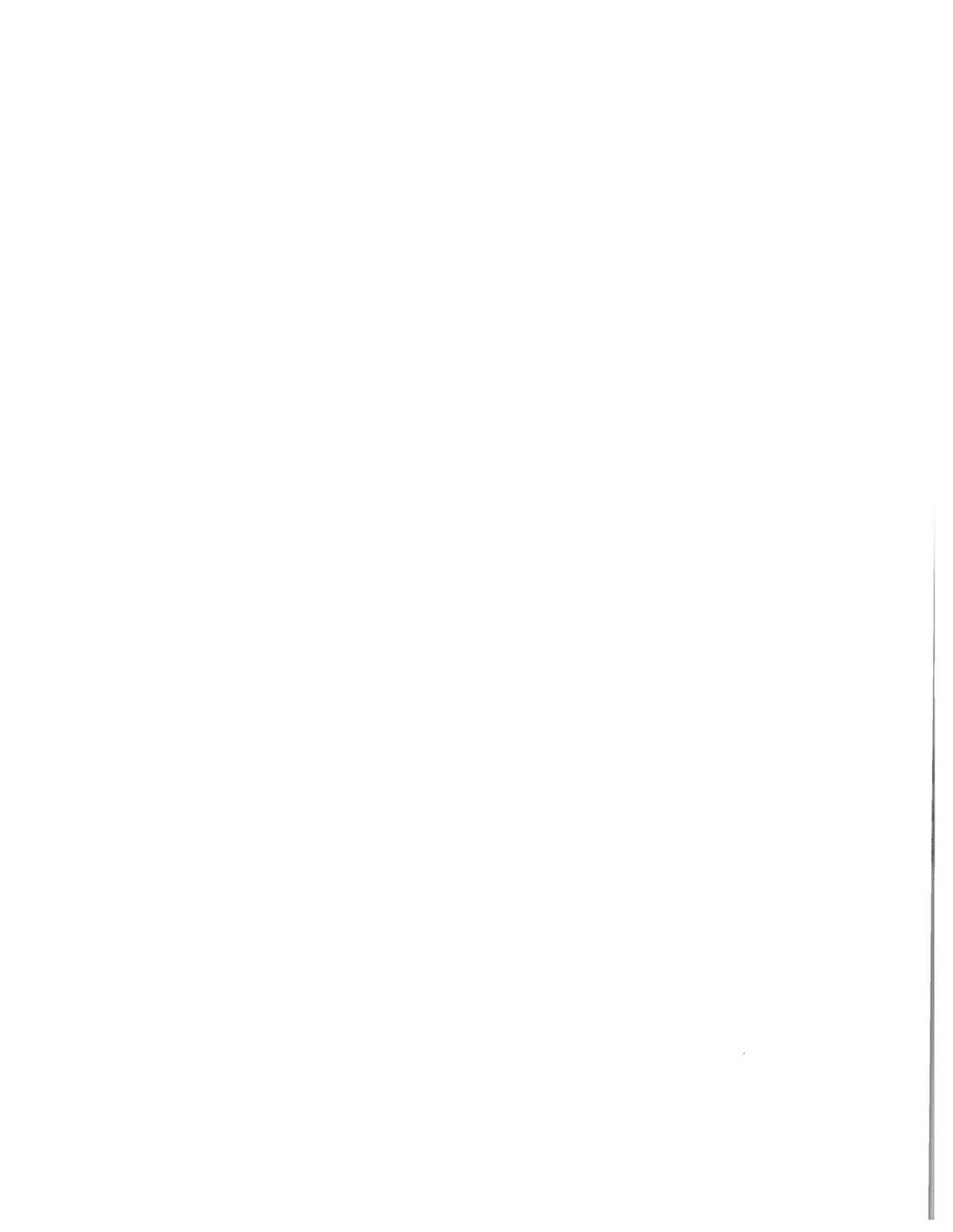
Les parvovirus possèdent une capsidie icosaédrique, non enveloppée et leur génome est d'ADN simple brin, de polarité négative, linéaire et d'environ 5kb. Il contient deux promoteurs, le premier p4, permet la synthèse des protéines non structurales NS1, NS2 et NS3, produites par épissage alternatif tandis que le deuxième, p40, est responsable de l'expression d'une protéine tardive non-structurale, la SAT, en plus des protéines structurales VP1 et VP2.

Les protéines VP1 et VP2 possèdent une séquence commune et c'est l'épissage alternatif qui détermine laquelle d'entre elles sera synthétisée. La plupart du temps, le codon d'initiation de VP1, situé dans un petit intron, est enlevé et par le fait même, c'est VP2 qui est synthétisée. La partie unique de la VP1 (VP1up) est située en N-terminal et, chez la plupart des parvovirus, elle n'est pas exposée à la surface de la capsidie des particules nouvellement formées. Par contre, elle est externalisée en cour d'infection grâce à l'acidification de la voie endosomale. Bien que la capsidie puisse entièrement être formée de VP2, VP1up est cruciale à l'infectivité. Deux propriétés peuvent expliquer son importance dans l'établissement d'une infection productive.

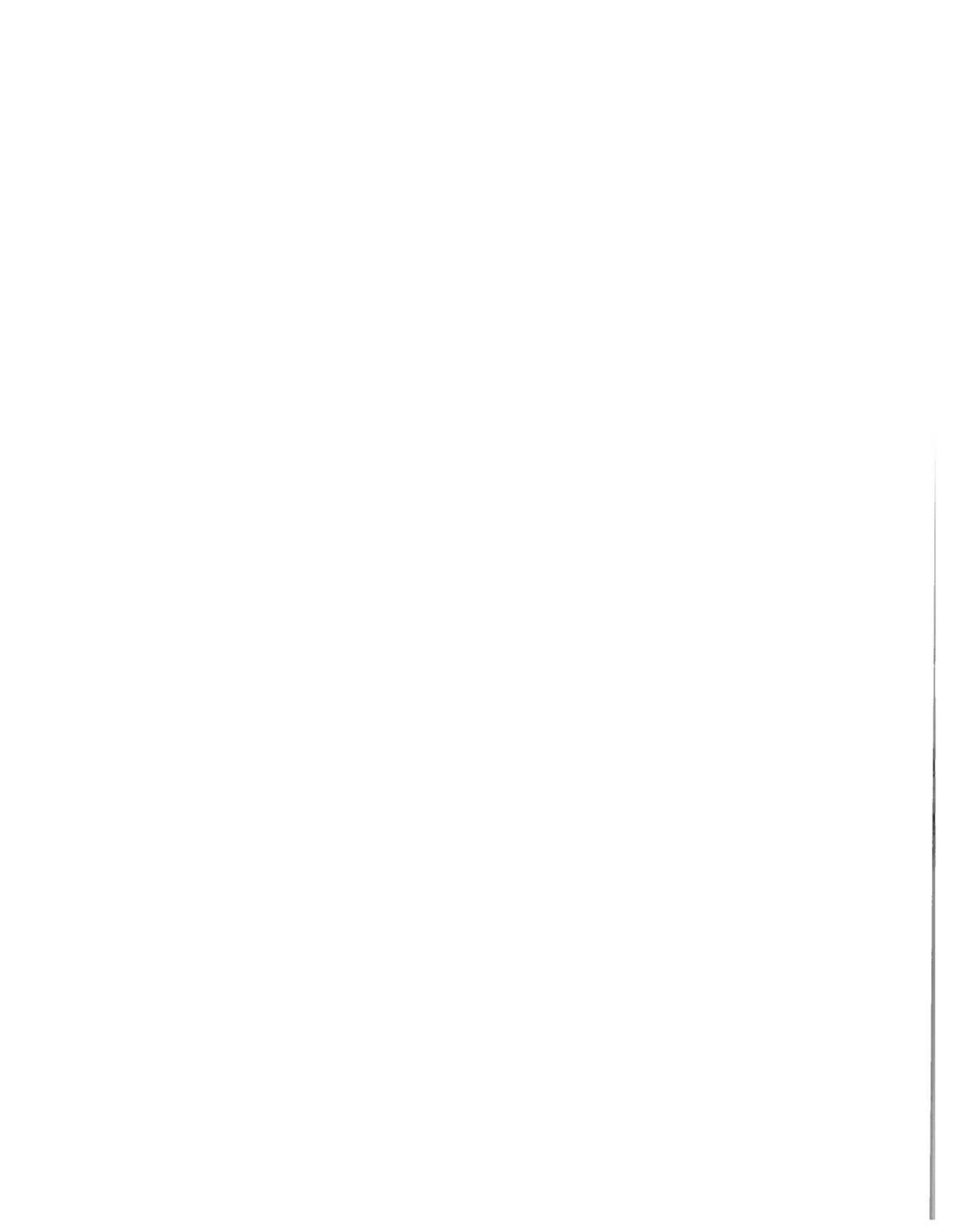
Premièrement, VP1up possède un motif phospholipase A₂ sécrétée (sPLA₂), extrêmement conservé parmi presque tous les parvovirus, qui est effectivement crucial à l'infectivité. Les sPLA₂s sont responsables de l'hydrolyse d'un résidu d'acide gras en *sn*-2 d'un phospholipide et cette activité, dans le cas de l'enzyme virale (pvPLA₂), est importante pour l'évasion de la voie endosomale et, possiblement, pour l'internalisation nucléaire. Toutefois, bien que l'enzyme virale soit très apparentée aux sPLA₂s, de nombreuses différences enzymatiques et structurales la distinguent de celles-ci. En raison de son importance dans l'infectivité et étant donné les caractéristiques qui la diffèrent des sPLA₂s, nous souhaitons élucider sa structure tridimensionnelle (3D) par résonance magnétique nucléaire (RMN). Ces résultats permettraient de faire un pas vers l'obtention d'inhibiteurs de celle-ci, ouvrant ainsi la voie au développement d'un

inhibiteur spécifique en tant que nouvelle classe de drogue antivirale contre les infections aux parvovirus et aussi les maladies associées.

En second lieu, VP1up contient cinq régions basiques qui pourraient hypothétiquement posséder une activité de transport nucléaire, nommées BR1 (aa 3 à 9), BR2 (aa 86 à 89), BR3 (aa 110 à 116), BR4 (aa 120 à 130) et BR5 (aa 137 à 141) et ainsi, en plus de la pvPLA₂, contribuer à son importance dans l'infectivité. En effet, celles-ci pourraient jouer un rôle dans l'internalisation nucléaire des virions lors des étapes précoces et des trimères de VP1/VP2 durant les étapes tardives. Il serait donc également intéressant de déterminer si ces régions correspondent à des signaux de localisation nucléaire (NLS) puis d'évaluer leurs rôles dans le cycle viral.



REVUE DE LITTÉRATURE



1. Généralités du parvovirus porcine

1.1 Découverte

C'est en 1965 que le syndrome de SMEDI (Stillbirth, Mummified, Embryonic Death and Infertility), associé à des problèmes de reproduction chez le porc, a été découvert par Howard Dunne (Dunne, 1965). Toutefois, ce n'est que quelques années plus tard que le parvovirus porcine (PPV) a été identifié comme étant l'agent causal de ce syndrome (Johnson et Collings, 1969).

1.2 Taxonomie

Le PPV appartient à la famille des *Parvoviridae* qui regroupe des petits virus non-enveloppés possédant un génome à ADN simple brin et une capsidie à symétrie icosaédrique. Cette famille se divise en deux sous-familles, les *Densovirinae* qui infectent les invertébrés et les *Parvovirinae* qui infectent plutôt les vertébrés. La sous-famille des *Densovirinae* se divise en quatre genres : *Brevidensovirus*, *Densovirus*, *Iteravirus*, et *Pefudensovirus*. La sous-famille des *Parvovirinae* se divise quant à elle en cinq genres : *Dependovirus*, *Erythrovirus*, *Bocavirus*, *Amdovirus* et *Parvovirus*. Le genre *Dependovirus* comprend les AAV (Adeno-Associated Virus) qui sont des virus non-autonomes dépendant donc d'une co-infection, par exemple par adenovirus, pour compléter leur cycle viral. Chez le genre *Erythrovirus*, on retrouve en outre le parvovirus humain B19. Celui-ci est responsable de la cinquième maladie chez l'enfant qui est également connue sous le nom d'érythème infectieux. Aussi, il peut être à l'origine de problèmes d'arthrite et d'avortements chez l'adulte. Le genre *Bocavirus* a été nommé à l'origine en raison des deux espèces qu'ils comportaient, le Parvovirus Bovin type 1 (BPV-1) et le Canine Minute Virus (CnMV). Les virus appartenant à ce genre possèdent une séquence en ADN différente de celle de tous les autres membres regroupés dans la sous-famille des *Parvovirinae*. Aussi, ceux-ci codent une phosphoprotéine nucléaire NP-1 contrairement aux autres virus appartenant à cette même sous-famille. Quant au genre *Amdovirus*, on n'y retrouve qu'un

seul membre, soit le Aleutian Mink Disease Virus (AMDV) mais plusieurs souches de ce virus sont maintenant connues. Celui-ci engendre une infection persistante qui altère le système immunitaire de mustélidés et d'autres rongeurs adultes (Cotmore et Tattersall, 2006). Finalement, le genre *Parvovirus*, chez lequel on retrouve le PPV, comprend plusieurs virus à réplication autonome qui sont très similaires au niveau de leur génome, leurs protéines et leur capsid. Par exemple, le parvovirus félin (FPV), le parvovirus canin (CPV) et le parvovirus murin (MVM) appartiennent également à ce genre (Mengeling *et al.*, 1988; Simpson *et al.*, 2002).

1.3 Transmission et virémie

Le PPV fait des ravages dans les troupeaux de porcs partout sur la planète et entraîne donc des pertes économiques considérables chez les éleveurs. Ce virus possède une grande résistance aux conditions environnementales. En effet, il peut demeurer plusieurs mois dans l'environnement sans être inactivé, ce qui facilite sa transmission (Mengeling, 1972). La transmission peut avoir lieu horizontalement ou verticalement.

Principalement, la transmission se fait de façon horizontale via les voies orales-fécales et oronasales. Plus précisément, l'excrétion dans les selles et les sécrétions orales du PPV pendant la phase aiguë de l'infection représentent les facteurs majeurs de dissémination du virus (Paul *et al.*, 1980).

La transmission peut également avoir lieu de façon verticale, c'est à dire de la mère aux embryons ou aux fœtus. Toutefois, ce type de transmission requiert une virémie chez la mère. En effet, la virémie est induite chez une truie séronégative en gestation suite à l'infection par le PPV et est requise pour que le virus puisse traverser la barrière placentaire afin d'infecter les embryons ou les fœtus. Le PPV entraîne une virémie et traverse la barrière placentaire en 23 à 32 jours lors d'une transmission par voie orale et en 15 jours lors d'une transmission

intra-musculaire (Joo *et al.*, 1976). Durant la première moitié de gestation, les anticorps de la mère n'accèdent pas au placenta, ainsi les embryons ou les fœtus sont très vulnérables à l'infection au cours de cette période puisqu'ils sont non immunocompétents. C'est pourquoi, il y a mort de ceux-ci lorsque l'infection a lieu durant les premiers 70 jours de gestation. Plus précisément, l'infection précoce des embryons ou des fœtus, avant le 35^e jour de gestation, entraîne leur dégénération et leur résorption tandis que l'infection des fœtus entre 35 et 70 jours est responsable de leur mort et de leur momification. Par contre, lorsque l'infection a lieu durant la deuxième moitié de gestation, soit après 70 jours, les fœtus survivent puisqu'ils sont alors immunocompétents et qu'ils peuvent donc combattre l'infection (Mengeling *et al.*, 1988; Nielsen *et al.*, 1991). Toutefois, la mort de fœtus immunocompétents peut être observée lorsque l'infection implique des souches hautement pathogènes (Kresse *et al.*, 1985).

L'infection par le PPV chez les animaux adultes est normalement inoffensive bien qu'une virémie transitoire (2-4 jours) ainsi qu'une faible leucopénie sont souvent observées dans la première semaine post-infection (Johnson et Collings, 1971). Toutefois, elle peut être responsable de problèmes lorsque la souche en cause est associée à des entérites et des dermatites (Kresse *et al.*, 1985). Effectivement, l'épidermite exsudative bactérienne causée par *Staphylococcus hyicus* peut être aggravée lors d'une co-infection avec la souche Kresse (Kim et Chae, 2004; Whitaker *et al.*, 1990).

1.4 Tropisme

Contrairement aux autres virus à ADN, les parvovirus sont incapables de stimuler les cellules au repos à entrer en division cellulaire. Ainsi, étant donné leur incapacité à induire la phase S, ils infectent principalement les cellules en division active chez l'hôte. Donc, les embryons, les fœtus, les jeunes animaux et les cellules en mitose active de tissus adultes, telles les cellules épithéliales de

l'intestin et hématopoïétiques, sont particulièrement vulnérables à l'infection par le PPV (Cotmore et Tattersall, 1995; Tijssen, 1999).

Ce sont des facteurs intracellulaires qui déterminent le tropisme du PPV *in vivo* (Oraveerakul *et al.*, 1993) et *in vitro* (Oraveerakul *et al.*, 1992; Ridpath et Mengeling, 1988). Effectivement, le PPV peut être internalisé aussi efficacement dans les cellules permissives que restrictives et la transfection de cellules restrictives ne résulte pas en la production de particules virales (Ridpath et Mengeling, 1988). Ce phénomène pourrait être expliqué par le fait que l'internalisation a lieu au moins en partie par des processus non-spécifiques (Boisvert *et al.*, 2010).

Le PPV est cultivé *in vitro* dans des lignées cellulaires immortalisées provenant de tissus de fœtus de porcs, telles les cellules ST et PT (testicules) et PK-14 (reins) (Bergeron *et al.*, 1993; Siegl et Gautschi, 1976).

1.5 Souches et pathogénie

Il existe peu de différences entre les séquences des différentes souches du PPV. Malgré leur homologie de séquence, les souches sont classées en quatre groupes selon leur capacité pathogène.

On retrouve dans le premier groupe les souches non-pathogènes qui n'entraînent qu'une faible virémie chez l'animal, comme KBSH et NADL-2. Les souches appartenant à ce groupe sont également incapable de traverser la barrière placentaire (Johnson et Collings, 1971; Mengeling et Cutlip, 1976; Mengeling *et al.*, 1984). Pour ces raisons, celles-ci sont susceptibles d'être utilisées pour la vaccination. Par exemple, NADL-2 est utilisée comme vaccin vivant modifié suite à plus de cinquante passages en culture cellulaire (Molitor et Joo, 1990). D'ailleurs, l'utilisation de ce vaccin permet de contrôler efficacement la transmission du PPV et par conséquent, permet de réduire significativement

les pertes économiques associées à cette infection (Wrathall, 1988). Bien que normalement ces souches soient inoffensives pour les embryons ou les fœtus, elles peuvent néanmoins entraîner leur mort lorsque l'inoculation à lieu *in utero* dans les fluides allantoïques (Cutlip et Mengeling, 1975; Mengeling et Cutlip, 1975), ce qui suggère que l'absence de pathogénicité chez celles-ci est conférée par leur incapacité à traverser la barrière placentaire.

Le deuxième groupe contient la souche NADL-8 qui a une pathogénicité intermédiaire. Plus précisément, celle-ci a la capacité de traverser le placenta, contrairement aux membres du premier groupe. Toutefois, elle cause des problèmes aux embryons ou aux fœtus uniquement lorsque l'infection a lieu durant les 70 premiers jours de gestation. En effet, l'immunocompétence est requise pour assurer leur défense contre l'infection sinon celle-ci engendre une virémie et leur mort (Ridpath et Mengeling, 1988).

Les souches les plus pathogènes se retrouvent dans le troisième groupe. La souche Kresse, isolée à partir de lésions cutanées, peut même provoquer la mort fœtal suite à l'acquisition de l'immunocompétence (Kresse *et al.*, 1985; Mengeling et Cutlip, 1975).

Finalement, les virus classés dans le quatrième groupe sont antigéniquement différents des membres des autres groupes. À titre d'exemple, la souche IAF-A83, reliée à des problèmes entériques, appartient à ce groupe (Bergeron *et al.*, 1996).

1.6 Propriétés physiques

L'importante compacité de la capsid des parvovirus leur confère une très grande stabilité aux conditions environnementales. Ils sont notamment résistants à des pH oscillants entre 3 et 9 et à des températures atteignant jusqu'à 70°C. De plus, ils sont résistants à différents solvants organiques comme le butanol, le

tétrachlorure de carbone, l'alcool et le chloroforme. Ils sont également insensibles à plusieurs enzymes telles que la DNase, la RNase, la pepsine et la trypsine. Cependant, ils sont inactivés lorsqu'exposés aux rayons UV, au détergent SDS (dodécyl sulfate de sodium), à la formaline, au β -propiolactone et aux agents oxydants (Arella *et al.*, 1990; Siegl *et al.*, 1985; Tijssen, 1999).

Lors d'une purification sur gradient de chlorure de césium (CsCl), les particules virales sont séparées en 3 bandes. Les 2 premières bandes regroupent les particules «pleines légères» et «pleines lourdes» et sont d'une densité respective de 1,41-1,43 g/cm³ et de 1,45-1,47 g/cm³. Celles-ci contiennent toutes deux de l'ADN viral mais différent au niveau de leur composition en protéines structurales VP2. La troisième bande, quant à elle, représente les particules vides, c'est-à-dire qui n'ont pas incorporées le génome viral, et est d'une densité de 1,32 g/cm³ (Tattersall et Ward, 1976).

2. Cycle de réplication des parvovirus

2.1 Étapes précoces

Étant donné leur capacité codante limitée, les parvovirus dépendent de la machinerie cellulaire pour assurer leur réplication. Ainsi, les premières étapes d'infection ont pour objectif le transport du virus jusqu'à son site de réplication, le noyau. Les mécanismes impliqués dans les étapes précoces du cycle d'infection de divers parvovirus demeurent peu connus. Par exemple, l'attachement du PPV à la surface cellulaire reste mal compris puisqu'aucun récepteur n'a encore été identifié. Cependant, l'implication des acides sialiques dans ce processus a été démontrée par l'inhibition presque complète de l'infection suite au traitement des cellules avec la neuraminidase. Suite à l'attachement, les particules virales sont internalisées par endocytose dirigée via les puits recouverts de clathrine et par macropinocytose, un processus non-spécifique (Boisvert *et al.*, 2010). Peu importe le mode d'entrée, les virions vont par la suite emprunter la voie endosomale afin d'assurer leur transport intracellulaire (Boisvert *et al.*, 2010;

Mani *et al.*, 2006; Vihinen-Ranta *et al.*, 1998). Bien que l'environnement soit très hostile dans cette voie, il ne serait pas surprenant que les particules virales puissent se rendre jusqu'aux lysosomes sans être inactivées étant donné leur grande résistance aux traitements physiques et enzymatiques. Néanmoins, afin de rejoindre son site de réplication, le virus, doit à un moment ou un autre s'évader de la voie endosomale. Il a été démontré que l'acidification de celle-ci est essentielle pour l'infectivité mais insuffisante puisque certaines composantes des vésicules sont également requises (Basak et Turner, 1992; Boisvert *et al.*, 2010; Ros *et al.*, 2006; Zádori *et al.*, 2001). Plus précisément, l'acidité et les composantes en question des endosomes tardifs et des lysosomes jouent un rôle dans l'évasion des virions via l'induction de changements conformationnels au niveau de la capsid. En effet, l'induction de ces modifications structurales entraîne le clivage de VP2 en VP3 menant à l'externalisation de la partie unique de VP1 (VP1up) et à l'augmentation de l'accessibilité du génome (Cotmore *et al.*, 1999; Lombardo *et al.*, 2002; Mani *et al.*, 2006; Suikkanen *et al.*, 2003; Vihinen-Ranta *et al.*, 2002). VP1up possède un motif phospholipase A₂ (PLA₂) et c'est cette activité enzymatique qui est impliquée dans l'échappement des virions des vésicules de la voie endosomale (Canaan *et al.*, 2004; Farr *et al.*, 2006; Suikkanen *et al.*, 2003). Une fois au cytoplasme, le PPV doit se rendre au noyau. Pour ce faire, il va emprunter le réseau de microtubules et sera transporté grâce à la protéine motrice dynéine. Il a été démontré, chez plusieurs parvovirus, que VP1up est impliquée dans leur ciblage au noyau via la présence d'une ou de plusieurs séquences se comportant comme des signaux de localisation nucléaire (NLS) (Lombardo *et al.*, 2002; Vihinen-Ranta *et al.*, 2002; Vihinen-Ranta *et al.*, 2000). Par la suite, l'activité protéolytique du protéasome est requise pour l'apprêtement des particules virales avant leur arrivée au noyau (Boisvert *et al.*, 2010). Finalement, il y a transport à travers les pores nucléaires du virus ou, minimalement, de son génome. Bien que les mécanismes de translocation nucléaire ne soient pas élucidés, quatre modèles peuvent être envisagés. Dans le premier, étant donné que la taille du virus est inférieure à la capacité maximale des pores nucléaires, la capsid intacte ou légèrement modifiée pourrait entrer

au noyau, où la décapsidation finale aurait lieu menant à la libération du génome. Pour ce qui est du deuxième modèle, il implique que le virus serait décapsidé au niveau du cytoplasme et qu'ensuite, le génome serait transporté au travers des pores nucléaires. Troisièmement, il est possible que la capsidite s'arrime aux pores nucléaires et qu'à cet endroit, il y ait décapsidation puis injection du génome au noyau. En dernier lieu, les virions pourraient traverser l'enveloppe nucléaire en introduisant des bris au niveau des membranes lipidiques, possiblement grâce à l'activité PLA₂ (Cohen *et al.*, 2006; Cohen et Pante, 2005).

2.2 Étapes intermédiaires

Comme mentionné précédemment, les parvovirus dépendent de la phase S du cycle cellulaire, qu'eux même ne peuvent induire, pour la réplication de leur génome puisque celui-ci est constitué d'ADN simple-brin de polarité négative (Pritchard *et al.*, 1978; Tattersall, 1972; Tattersall *et al.*, 1973). Ainsi, la première étape vers la transcription du génome est la conversion de l'ADN monocaténaire en un intermédiaire double-brin (Siegl et Gautschi, 1976; Tattersall *et al.*, 1973). Plus précisément, c'est le repliement des séquences palindromiques, qui peuvent alors servir d'amorces aux polymérases cellulaires, qui initie le processus (Bourguignon *et al.*, 1976). La première forme du génome bicaténaire, la forme monomérique réplivative (mRF), est obtenue suite à l'action de plusieurs protéines cellulaires, telles la polymérase δ et ses cofacteurs, une ligase, la cycline A et la cyclin-dépendant kinase 2 (cdk2) (Bashir *et al.*, 2000; Bashir *et al.*, 2002; Cotmore *et al.*, 1989; Truyen *et al.*, 1993). Cette forme sert ensuite de matrice pour la transcription des gènes NS à partir du promoteur P4 (Deleu *et al.*, 1999). Ultérieurement, la réplication du génome a lieu suivant un mécanisme similaire à celui du cercle-roulant : le modèle de l'épingle roulante (rolling hairpin) (Cotmore et Tattersall, 1995; Tattersall et Ward, 1976). Aussi, elle nécessite les activités endonucléase (Nüesch *et al.*, 1995; Rhode et Paradiso, 1989) et hélicase 3'-5' (Jindal *et al.*, 1994) des oligomères phosphorylés de la protéine

NS1 pour assurer, tout d'abord, la réplication de l'extrémité droite du génome puis celle de l'extrémité gauche.

2.3 Étapes tardives

Plus tard dans l'infection, les gènes VP sont transcrits à partir du promoteur p40 menant à la traduction cytoplasmique des protéines structurales. Puis, celles-ci sont transportées sous forme de trimères homo- ou oligomériques (VP2 seulement ou VP2 et VP1) jusqu'au noyau, site d'assemblage des capsides, notamment grâce à l'activité de transport nucléaire d'un motif formé lors de l'oligomérisation des protéines structurales. Dans le cas des trimères de VP2 et de VP1, il est possible que un ou des motifs de VP1up soient également impliqués dans leur internalisation. Par exemple, il a été mis en évidence que la VP1up du MVM possède une séquence avec forte activité de transport nucléaire collaborant avec le NLM pour le ciblage au noyau de ce type de trimère (Clemens *et al.*, 1992; Lombardo *et al.*, 2000; Lombardo *et al.*, 2002; Rioloobos *et al.*, 2006; Tsao *et al.*, 1991). Ensuite, la protéine NS1 assure la translocation du génome de polarité négative, généré suite à l'excision de l'ADN viral en forme monocaténaire, dans les capsides préformées (Clemens *et al.*, 1992; Cotmore et Tattersall, 2005; Tattersall, 2006). Pour sa part, NS2 joue un rôle dans l'export nucléaire des particules virales nouvellement formées (Eichwald *et al.*, 2002; Engelsma *et al.*, 2008). Finalement, les virions synthétisés *de novo* sont relâchés dans le milieu extracellulaire, préalablement et ultérieurement à la lyse de la cellule (Caillet-Fauquet *et al.*, 1990), laquelle est induite via l'interaction de NS1 et de NS2 (Legrand *et al.*, 1993) (et de SAT (Zadori *et al.*, 2005) avec plusieurs protéines cellulaires.

3. Composantes des parvovirus

3.1 Génome

3.1.1 Structure et organisation

Les parvovirus possèdent tous un génome d'ADN simple brin, linéaire, de polarité négative (à l'exception de Lu III) et d'environ 5 kb. Leur génome contient également des séquences palindromiques à ses deux extrémités qui diffèrent au niveau de leur longueur et de leur séquence. Par convention, le palindrome en 3' du brin non-codant est désigné l'extrémité gauche tandis que le palindrome opposé est nommé extrémité droite (figure 1a) (Cotmore et Tattersall, 1987; Rhode et Richard, 1977). Les répétitions de séquences à chacune des extrémités sont organisées de manière à permettre le repliement du génome en structures d'épingle-à-cheveux de différentes conformations. Plus précisément, l'extrémité gauche est repliée en forme de «Y» et est constituée de 115 à 121 nucléotides selon l'espèce (Cotmore et Tattersall, 2006), 117 dans le cas du PPV (Bergeron *et al.*, 1993). Ce palindrome joue un rôle important dans la conversion de l'ADN monocaténaire en un intermédiaire double-brin en servant d'amorce pour la synthèse du brin codant. Aussi, elle régule l'activité des promoteurs. Quant à elle, l'extrémité droite adopte une forme de «T», a une longueur variant entre 200 et 248 nucléotides, 220 chez le PPV, et est essentiel à la réplication du génome selon un modèle analogue à celui du cercle-roulant (Bergeron *et al.*, 1993; Bourguignon *et al.*, 1976).

Aussi, le génome des parvovirus comprend deux grands cadres de lecture ouverts (ORFs) de même orientation. Chacun d'entre eux contient une unité transcriptionnelle distincte qui est sous le contrôle d'un promoteur, p4 dans le cas de l'ORF à l'extrémité 5' du brin codant et p40 en ce qui concerne l'ORF voisine. Le promoteur p4 régule l'expression des protéines non-structurales NS1, NS2 et NS3 tandis que les protéines structurales VP1 et VP2 sont plutôt sous le contrôle

du promoteur p40 (Cotmore et Tattersall, 1987, 1995). Il est à noter qu'afin de faciliter la nomenclature des diverses régions du génome, le brin codant a été divisé en 100 unités de cartographie et les promoteurs ont été nommés en fonction de leur position selon ces unités. Ainsi, les promoteurs p4 et p40 se trouvent à 4% et 40% de l'extrémité gauche du génome, respectivement (figure 1a). De plus, on retrouve un petit ORF dans le génome des parvovirus. La présence de cet ORF, codant pour la protéine non-structurale tardive SAT (Small Alternatively Translated protein), a été mise en lumière par des études récentes. L'ORF-SAT est effectivement conservé parmi tous les membres du genre *Parvovirus* et est d'environ 60 codons. Il est situé en 5' de l'ORF des protéines VP, plus précisément à quatre nucléotides, sept exceptionnellement dans le cas du PPV, en aval du codon d'initiation de VP2 (Zadori *et al.*, 2005).

3.1.2 Profil de transcription

En raison de la petite taille de leur génome, les parvovirus utilisent largement l'épissage alternatif afin de maximiser leur capacité codante (Pintel *et al.*, 1983). Comme mentionné précédemment, le génome des parvovirus possède deux ORFs qui sont chacun sous le contrôle d'un promoteur spécifique. Un transcrit primaire est généré à partir de chacun des promoteurs et ceux-ci peuvent par la suite donner naissance à différents patrons d'épissage alternatif. En effet, deux introns peuvent être excisés chez le PPV, un grand en amont du promoteur p40 et un petit en aval de celui-ci. D'ailleurs, ce dernier est éliminé de tous les transcrits (Jongeneel *et al.*, 1986; Pintel *et al.*, 1983). Pour l'épissage de cet intron, on retrouve deux sites donneurs, D1 et D2, et un seul site accepteur, A1 dans le cas du PPV ainsi que du CPV (figure 1b) (Bergeron *et al.*, 1993; Reed *et al.*, 1988). Cependant, un deuxième site accepteur, A2, existe dans le cas des parvovirus MVM et H-1 (Jongeneel *et al.*, 1986; Lebovitz et Roeder, 1986; Morgan et Ward, 1986).

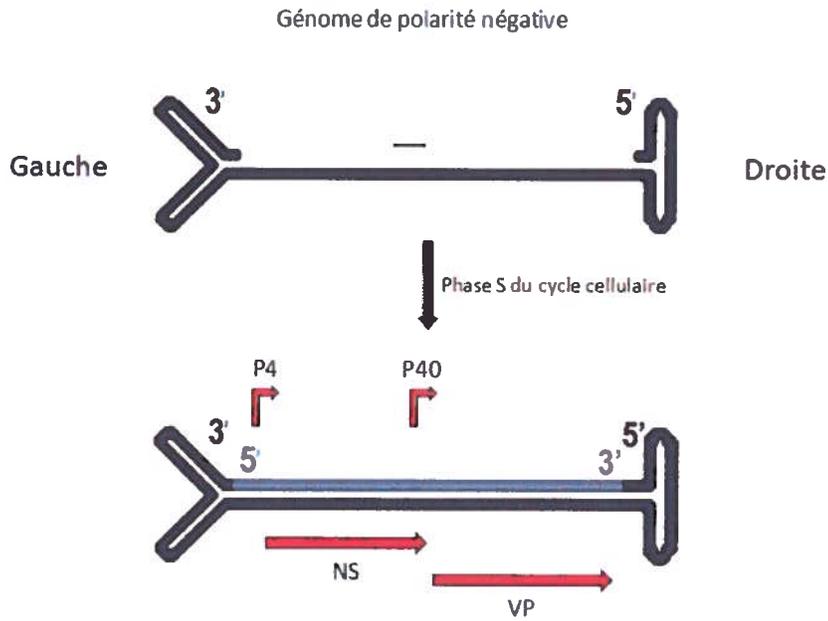
Tout d'abord, l'expression des protéines NS précoces est régulée par le promoteur p4. Le transcrit primaire est généré, polyadénylé puis épissé. Chez le PPV, il y a trois ARNm qui sont produits à partir de ce promoteur (Bergeron *et al.*, 1993). Pour le premier transcrit, soit R1, il n'y a que le petit intron qui est épissé et celui-ci code la NS1. Le transcrit R2 code quant à lui pour NS2 et lors de la maturation, celui-ci perd le grand intron en plus du petit (figure 1b). Chez MVM, le petit intron se trouve dans l'ORF des protéines NS, c'est-à-dire en amont du promoteur p40, contrairement au PPV (Pintel *et al.*, 1995). Par surcroît, étant donné qu'on retrouve un deuxième site accepteur chez ce virus, les combinaisons possibles d'épissage sont plus nombreuses. Pour ces raisons, on retrouve chez MVM trois types d'isoformes NS2 bien que NS3 est absente (Bergeron *et al.*, 1993; Cotmore et Tattersall, 1995). Troisièmement, pour sa part, le transcrit R3 subit un saut d'intron («intron skipping»). Ainsi, tout comme pour R2, les 2 introns sont épissés mais dans son cas toute la région située entre ceux-ci est également éliminée. La protéine encodée par ce transcrit, soit NS3, est possiblement produite chez le PPV afin de pallier à l'absence d'isoformes NS2 (figure 1b).

En deuxième lieu, la transcription des gènes tardifs est initiée par le promoteur p40. Les protéines structurales VP1 et VP2 sont toutes les deux produites à partir du transcrit R4 (Bergeron *et al.*, 1993; Jongeneel *et al.*, 1986; Labieniec-Pintel et Pintel, 1986; Tattersall *et al.*, 1977). C'est l'épissage alternatif du petit intron, suite à la polyadénylation, qui détermine lequel des ARNm sera généré. L'utilisation du site donneur D1 est responsable de la délétion du codon AUG de VP1. Au contraire, lorsque le site donneur D2 est utilisé, le codon d'initiation de VP1 est conservé et c'est cette protéine qui est synthétisée au détriment de VP2 (Tijssen *et al.*, 1995). Toutefois, il faut mentionner que le profil d'épissage utilisant le site D1 est dominant de manière à ce que VP2 soit préférentiellement produite. En effet, l'épissage alternatif est une façon de moduler la quantité d'ARNm matures générés et l'utilisation de cette stratégie lors de l'expression des protéines structurales permet de favoriser la production

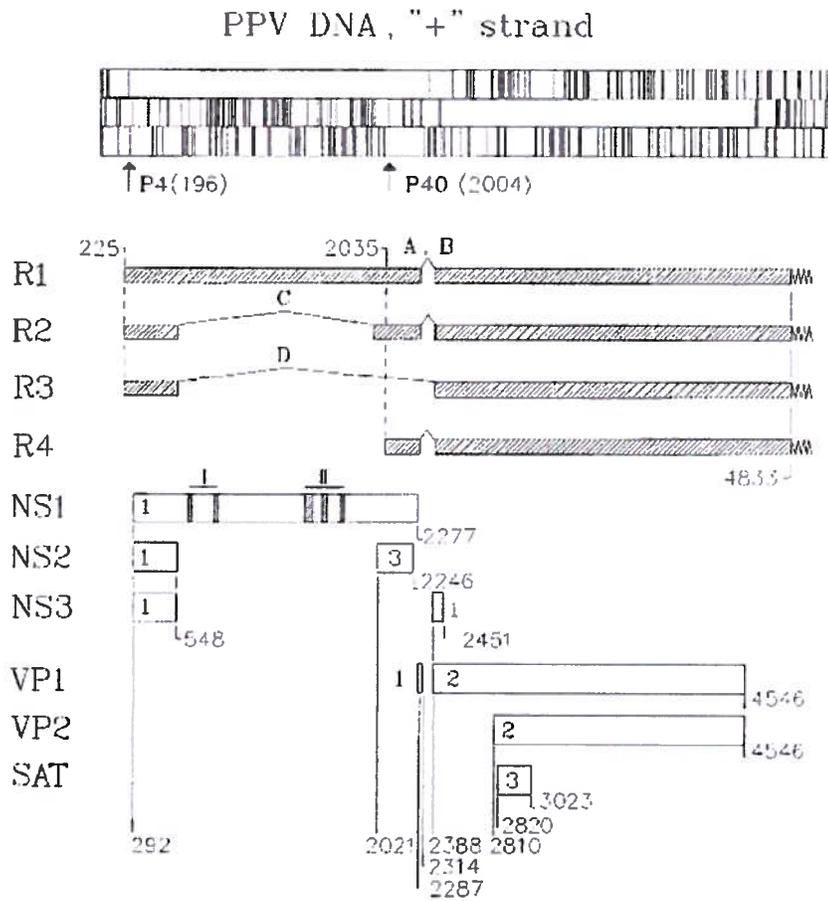
de VP2, la protéine majoritaire de la capsid (Pintel *et al.*, 1995). Finalement, une troisième protéine peut également être traduite à partir des transcrits matures R4. En effet, l'existence de la protéine SAT a été mise en lumière grâce à des études récentes (Zadori *et al.*, 2005). Son codon AUG se situe très près en aval de celui de VP2 et bien que le mécanisme exact permettant la traduction de SAT demeure inconnu, il est possible qu'un environnement défavorable au niveau du codon de départ de VP2 mène à l'utilisation de celui de SAT (figure 1b) (Kozak, 1985).

Figure 1. Génome du PPV. A. Schéma de la structure et de l'organisation du génome. Le génome est simple brin, linéaire, de polarité négative et chacune de ses extrémités est formée de séquences quasi-palindromiques. Par convention, le palindrome en 3'-OH du brin non-codant est désigné l'extrémité gauche et celui opposé est nommé extrémité droite. Le promoteur p4, situé dans la région 5' du brin codant, assure la transcription du gène des protéines non-structurales (NS) tandis que la moitié droite du génome, sous le contrôle du promoteur p40, porte le gène des protéines structurales (VP). **B.** Profil de transcription du génome. Le génome possède deux grands ORFs et plusieurs plus petits. Un seul transcrit primaire (pré-ARNm) est généré à partir de chacun des promoteurs, le p4 et le p40, situées aux nucléotides 196 et 2004 respectivement. Le pré-ARNm régulé par le promoteur p4 débute au nucléotide 225 et est polyadénylé au nucléotide 4833. Trois transcrits résultent de l'épissage alternatif de celui-ci. Le transcrit R1 est généré lors de l'excision du petit intron (A-B) et code la NS1 portant un motif de liaison à l'ADN dans sa région N-terminal (souligné I) et un motif hélicase-dépendant de l'ATP dans sa région C-terminal (souligné II). Le transcrit R2 résulte de l'épissage du petit et du grand intron (C) et code la NS2. Le transcrit R3 est épissé entre le donneur du grand intron et l'accepteur de celui du petit (D), et est responsable de l'expression de NS3. Le pré-ARNm régulé par le promoteur p40 est initié au nucléotide 2035 et est également polyadénylé au nucléotide 4833. Celui-ci est épissé uniquement au niveau du petit intron, générant ainsi le transcrit R4. VP1 et VP2 sont traduites selon le choix du site donneur utilisé lors de l'excision de cet intron. Deux sites donneurs existent, D1 et D2, aux positions 2280-AG/GT et 2313-AG/GT respectivement tandis qu'il n'y a qu'un seul site accepteur, A1, à la position 2386-AG/GA. Le site D1 est préférentiellement utilisé et puisqu'il se trouve en amont du codon d'initiation de VP1, contrairement au site D2 qui se trouve en aval de celui-ci, c'est VP2 qui est favorisée. L'épissage utilisant le site D1 peut aussi mener à la traduction de SAT si son codon d'initiation, situé à 7 nucléotides en aval de celui de VP2, est utilisé. Tiré et modifié de (Bergeron *et al.*, 1993).

A



B



3.2 Capside

3.2.1 Caractéristiques

Les parvovirus possèdent une capsid non-enveloppée, de diamètre d'environ 25 nm et de symétrie icosahédrale avec une lattice de triangulation (T) égale à un. Chacune de ses 20 faces est composée d'un trimère de protéines structurales puisqu'elle est formée de 60 capsomères. Plus précisément, celle-ci est composée principalement par VP2 ou encore par son produit de clivage, VP3 (Tsao *et al.*, 1991). VP1 ne peut effectivement pas constituer la protéine majoritaire de la capsid puisque sa région N-terminal non-partagée avec VP2 lui confère une structure trop compacte. En plus d'assurer la protection du génome, la capsid joue un rôle crucial dans les étapes précoces de l'infection, entre autres lors de l'attachement et du transport jusqu'au noyau. La structure de la capsid de plusieurs parvovirus, dont le PPV, a été élucidée par cristallographie aux rayons-X (figure 2a) (Agbandje-McKenna *et al.*, 1998; Agbandje *et al.*, 1993; Chapman et Rossmann, 1996; Simpson *et al.*, 2002; Tsao *et al.*, 1992; Wu et Rossmann, 1993; Xie et Chapman, 1996).

3.2.2 Structure secondaire, tertiaire et quaternaire

Il existe une identité de 50% ou plus au niveau des séquences des protéines structurales des membres de la famille des *Parvoviridae*. De plus, la structure secondaire de ces protéines est fortement conservée entre les différentes espèces (Chapman et Agbandje-McKenna, 2006). Chacune des unités protéiques est arrangées en deux feuillets- β , BIDG et CHEF, formés de huit brins antiparallèles qui eux-mêmes sont reliés par des boucles de longueurs variables (Agbandje *et al.*, 1995). Le feuillet le plus court, CHEF, se replie sur l'autre feuillet afin de former un baril- β qui est positionné à proximité du côté interne de la capsid. Il est à noter qu'il existe peu de variabilité au niveau de la composition interne de la capsid des parvovirus. Les boucles ont une longueur de cinq à 72 résidus, à

l'exception de la boucle GH de plus grande taille, 220 acides aminés chez le PPV, conservée parmi les membres du genre *Parvovirus* (Simpson *et al.*, 2002; Xie et Chapman, 1996). Celles-ci se situent près de la façade externe et représentent environ 80% de la composition en résidus de la capsid (Chapman et Agbandje-McKenna, 2006). Par ailleurs, ces acides aminés sont pauvrement conservés entre les diverses espèces et leur confèrent des propriétés antigéniques distinctes (Agbandje-McKenna *et al.*, 1998; Hernando *et al.*, 2000; Kontou *et al.*, 2005; Llamas-Saiz *et al.*, 1996; Simpson *et al.*, 2000; Simpson *et al.*, 2002; Truyen *et al.*, 1994). Ces boucles forment toutefois des structures caractéristiques aux axes de symétrie de la surface des capsides des parvovirus et ce, bien qu'il existe peu d'homologie de séquences (Chapman et Agbandje-McKenna, 2006).

3.2.3 Axes de symétrie

La capsid des parvovirus possède trois axes de symétrie d'ordre 2, 3 et 5. Sur l'axe de symétrie 3 est retrouvée une protubérance formée par les boucles GH de trois protéines adjacentes inter-reliées symétriquement (Tsao *et al.*, 1991). Cette élévation a un diamètre de 70Å et une hauteur de 22Å et est nommée spicule. Certains résidus formant les spicules du MVM et du PPV jouent un rôle important dans le tropisme des différentes souches de chacun de ces virus (Agbandje-McKenna *et al.*, 1998; Ball-Goodrich et Tattersall, 1992; Bergeron *et al.*, 1996; Gardiner et Tattersall, 1988; Simpson *et al.*, 2002). Deux protéines interagissent entre elles au niveau de l'axe de symétrie 2 donnant naissance à une dépression appelée fossette (Tsao *et al.*, 1991). Les résidus situés dans cette région sont impliqués dans la liaison à l'acide sialique. D'ailleurs, l'interaction virale avec cette molécule confère l'activité d'hémagglutination retrouvée chez plusieurs parvovirus (figure 2b) (Barbis *et al.*, 1992; Lopez-Bueno *et al.*, 2006; Tresnan *et al.*, 1995). Enfin, l'axe de symétrie 5, situé au milieu d'un pentamère constitué de cinq capsomères arrangés de façon symétrique, est caractérisé par une structure cylindrique, formant un canal,

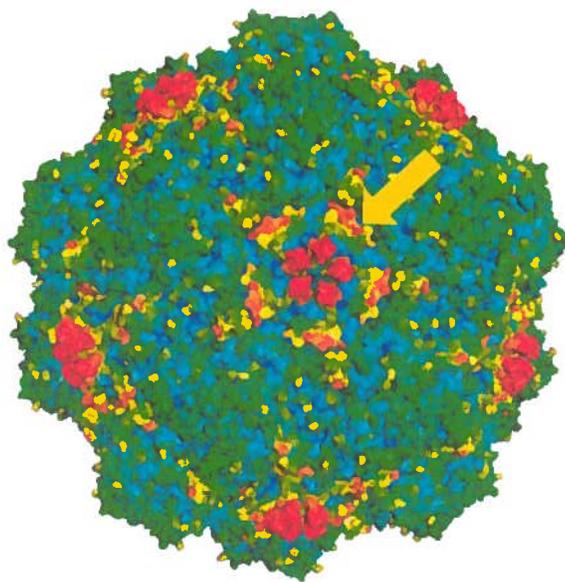
entourée par une dépression nommée canyon (Chapman et Rossmann, 1993; Tsao *et al.*, 1991). Le canal est généré suite au repliement des domaines N-terminaux riches en glycines des protéines structurales (Wu *et al.*, 1993; Wu et Rossmann, 1993; Xie et Chapman, 1996). Celui-ci est essentiel à l'externalisation de la région unique de VP1 lors des étapes précoces et de la région N-terminal de VP2 ainsi qu'à l'internalisation du génome viral durant les étapes tardives de l'infection (figure 2a et b) (Agbandje-McKenna *et al.*, 1998; Chapman et Agbandje-McKenna, 2006; Chapman et Rossmann, 1996; Farr et Tattersall, 2004; Xie et Chapman, 1996). Ainsi, les capsides sont formées par trois types d'oligomères, des dimères, des trimères et des pentamères.

3.2.4 Assemblage

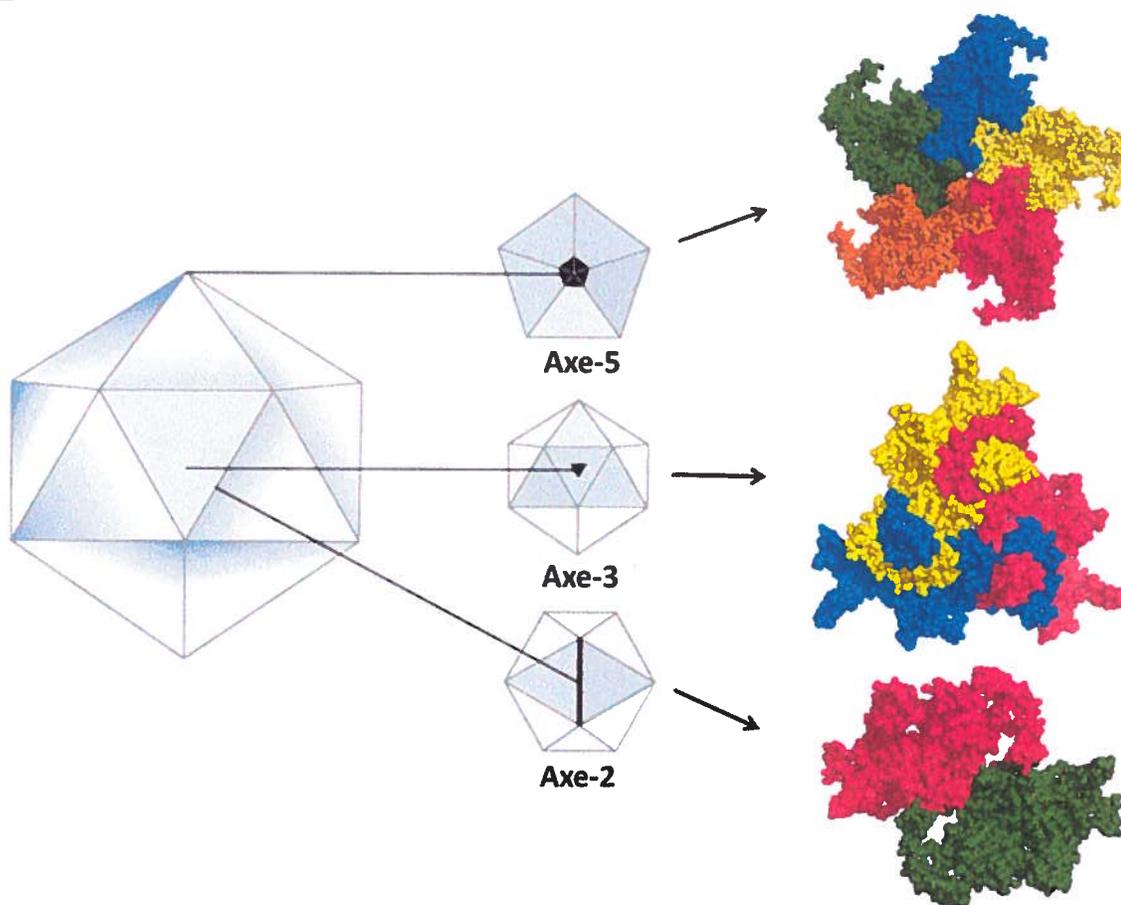
En accord avec le niveau d'interaction et les différences dans la stabilité entre les sous-unités protéiques, des études suggèrent que les trimères sont les premiers oligomères à s'assembler lors de la formation des capsides des parvovirus. En effet, il a été démontré que les interactions entre acides aminés sont plus importantes autour de l'axe de symétrie 3, en comparaison aux deux autres axes. Aussi, il a été observé que l'énergie de dissociation des trimères est supérieure à celle des dimères et des pentamères (Chapman et Agbandje-McKenna, 2006; Chapman et Rossmann, 1993; Xie et Chapman, 1996; Yuan et Parrish, 2001). De plus, la démonstration de la facilité avec laquelle ces oligomères peuvent être chimiquement réticulés et purifiés *in vitro* (Riolobos *et al.*, 2006) et de la formation d'un motif de localisation nucléaire (NLM) du côté interne des intermédiaires trimériques (Lombardo *et al.*, 2000) a également validé cette hypothèse. La présence de ce NLM signifie que les protéines structurales s'assemblent en trimères, suite à leur traduction cytoplasmique, avant d'être transloquées au noyau grâce, ou du moins en partie, à ce motif (Lombardo *et al.*, 2000; Riolobos *et al.*, 2006). Enfin, il est important de rappeler que les sous-unités en question sont homo- ou oligomériques, soit composées juste de VP2 ou de VP1 et VP2 respectivement (Tsao *et al.*, 1991).

Figure 2. Capside des parvovirus. A. Structure de la capside du PPV. La structure de la capside de nombreux parvovirus, dont celle du PPV, a été obtenue par cristallographie aux rayons-X. La stabilité de la capside est illustrée par un gradient de couleurs allant du bleu foncé, pour les acides aminés les plus stables, au rouge, pour ceux les plus flexibles. La flèche pointe un canal formé suite au repliement des régions N-terminales riches en glycines des protéines structurales constituant un pentamère. **B.** Axes de symétrie de la capside. La capside contient trois axes de symétrie d'ordre 2, 3 et 5. Ceux-ci sont générés suite à l'arrangement symétrique de protéines structurales sous forme de dimères, de trimères et de pentamères, respectivement. Au niveau de l'axe de symétrie 2, on retrouve une dépression nommée fossette. L'axe de symétrie 3 est caractérisé par une protubérance appelée spicule. Sur l'axe de symétrie 5 est retrouvé un canal entouré d'une large dépression appelée canyon.

A



B



3.3 Protéines

3.3.1 Non-structurales

3.3.1.1 NS1

La protéine NS1, composée de 662 acides aminés, est exprimée lors des étapes précoces du cycle viral et a une masse moléculaire apparente de 84 à 86 kDa selon son degré de phosphorylation (Molitor *et al.*, 1985). En revanche, sa masse théorique est de 75,5 kDa préalablement aux modifications post-traductionnelles (Bergeron *et al.*, 1993; Brandenburger *et al.*, 1990). Cette protéine a été majoritairement étudiée chez MVM. Par contre, l'homologie de séquence entre cette protéine et celle du PPV est d'environ 80%, ce qui suggère que la plupart des fonctions cruciales de NS1 sont similaires chez ces virus (Bergeron *et al.*, 1996; Bergeron *et al.*, 1993). Des études portant sur sa stabilité ont démontré que sa demi-vie est longue de manière à ce qu'elle demeure présente en quantité importante même ultérieurement à la diminution de l'activité du promoteur précoce (Cotmore et Tattersall, 1990; Schoborg et Pintel, 1991). D'ailleurs, cette protéine exerce des fonctions cruciales durant tout le cycle de réplication viral, mais principalement au niveau du noyau. En effet, elle est rapidement relocalisée à cet organite suite à sa synthèse (Cotmore et Tattersall, 1986; Rhode et Paradiso, 1989) grâce à son signal de localisation nucléaire (NLS) bipartite (Nüesch et Tattersall, 1993). Plus précisément, ses fonctions principales sont directement liées à la réplication du génome viral, fonctions qu'elle assure via ses activités ATPase, hélicase et endonucléase (Astell *et al.*, 1987; Rhode et Paradiso, 1989; Vanacker et Rommelaere, 1995; Wilson *et al.*, 1991). Néanmoins, elle joue également des rôles dans la transactivation du promoteur p40 (Rhode, 1985), dans la régulation de son propre promoteur (Hanson et Rhode, 1991), dans l'encapsidation de l'ADN viral et dans l'induction d'effets cytotoxiques (Brandenburger *et al.*, 1990). Finalement, l'oligomérisation cytoplasmique de la protéine est nécessaire à ses fonctions (Pujol *et al.*, 1997) et

son état de phosphorylation module son activité *in vitro* (Nuesch, Corbau, *et al.*, 1998; Nuesch, Dettwiler, *et al.*, 1998) et *in vivo* (Corbau *et al.*, 1999).

3.3.1.2 NS2

La protéine NS2 est également exprimée durant les étapes précoces du cycle viral. Chez le PPV, elle est composée de 161 acides aminés, dont les 86 premiers sont partagés avec NS1 (Bergeron *et al.*, 1993), et a une masse moléculaire théorique de 18,1 kDa. En revanche, sa masse apparente est probablement plus élevée puisqu'elle subit des modifications post-traductionnelles (Bergeron *et al.*, 1993; Cotmore et Tattersall, 1990). Il existe une seule isoforme de la NS2 du PPV bien qu'on retrouve trois isoformes de cette protéine chez de nombreux parvovirus, dont le MVM (Bergeron *et al.*, 1993). L'homologie de séquence entre la région commune de NS1 et NS2 du PPV et celles des autres membres du genre *Parvovirus* est importante tandis que l'homologie de séquence entre les régions uniques de NS2 de ces divers parvovirus est plus modeste. Aucune étude n'a directement été effectuée sur la NS2 du PPV et les fonctions putatives qui lui sont attribuées dérivent de recherches sur la protéine du MVM. À l'opposé de NS1, sa demi-vie est courte et elle est principalement cytoplasmique (Cotmore et Tattersall, 1990; Miller et Pintel, 2001). Elle assure des fonctions dans la régulation de la synthèse des protéines virales (Naeger *et al.*, 1993), dans l'accumulation de formes répliquatives du génome (Cotmore *et al.*, 1997; Naeger *et al.*, 1990) et dans l'infectivité (Cater et Pintel, 1992), quoique celles-ci soient dépendantes du type cellulaire. Elle est également impliquée dans l'assemblage des capsides (Cotmore *et al.*, 1997) et elle agit en synergie avec NS1 pour l'induction d'effets cytopathiques *in vitro* (Legrand *et al.*, 1993; Li et Rhode, 1991). Enfin, cette protéine joue un rôle au niveau de la pathogénèse du virus *in vivo* (Brownstein *et al.*, 1992; Li et Rhode, 1991).

3.3.1.3 NS3

La protéine NS3 du PPV possède une masse moléculaire de 12,4 kDa et est composée de 106 acides aminés (Bergeron *et al.*, 1993). Toute sa région N-terminal, comprenant ses 86 premiers résidus, est commune à NS1 et NS2 tandis que les 20 acides aminés de son extrémité C-terminal lui sont uniques. Aussi, la région codante de cette extrémité chevauche l'ORF des protéines VP. Le transcrit R3 permettant la traduction de NS3 a bel et bien été identifié et séquencé, en revanche, l'existence de cette protéine n'a jamais été prouvée. Celle-ci n'est hypothétiquement requise que dans certains types cellulaires et ce, à d'infimes niveaux (Tijssen *et al.*, 1995).

3.3.1.4 SAT

Contrairement aux autres protéines non-structurales, la petite protéine SAT est exprimée sous le contrôle du promoteur p40 donc lors des étapes tardives de l'infection. Chez le PPV, elle est composée de 68 résidus et a une masse moléculaire théorique de 7,4 kDa. On retrouve cette protéine chez les membres des genres *Parvovirus* et *Amdovirus* (Zadori *et al.*, 2005) ainsi que chez les nouveaux « Hokovirus » (Szelei *et al.*, 2010). Par contre, sa séquence n'est pas conservée parmi ces divers parvovirus bien que sa structure secondaire sous forme d'hélices- α transmembranaires le soit. Des études suggèrent que SAT est ciblée à la membrane du réticulum endoplasmique où elle induirait un stress cellulaire. Ainsi, elle contribuerait aux effets cytopathiques de manière à promouvoir la lyse de la cellule. Enfin, elle pourrait également être impliquée dans l'échappement des réponses immunitaires (Zadori *et al.*, 2005).

3.3.2 Structurales

3.3.2.1 VP2 et VP3

La protéine VP2 est exprimée durant les étapes tardives du cycle viral. Chez le PPV, elle est composée de 579 acides aminés et a une masse moléculaire apparente de 64 kDa (Molitor *et al.*, 1983). Elle constitue la protéine majoritaire de la capside des parvovirus, c'est-à-dire qu'elle représente environ 80 à 90% de sa composition. La séquence de VP2 est entièrement comprise dans celle de VP1. Ces protéines possèdent effectivement une séquence commune et c'est l'épissage alternatif qui détermine laquelle de celles-ci sera synthétisée. La plupart du temps, le codon d'initiation de VP1, situé dans un petit intron, est enlevé et par le fait même, c'est VP2 qui est produite, son codon d'initiation étant conservé (figure 3) (Pintel *et al.*, 1995; Tijssen *et al.*, 1995). Les capsides peuvent entièrement être formées par cette protéine, toutefois, de telles capsides ne donnent pas naissance à des particules virales infectieuses bien qu'elles peuvent efficacement internaliser le génome et se lier à la surface cellulaire. En effet, la région unique de VP1 (VP1up), située en N-terminal de la protéine, est requise pour l'infectivité (Agbandje *et al.*, 1995; Arella *et al.*, 1990; Tullis *et al.*, 1993).

La région N-terminal de VP2 (2Nt) d'environ 20 résidus est externalisée tardivement au niveau d'un domaine fortement conservé riche en glycines qui lui confère la flexibilité nécessaire à ce processus. L'externalisation a lieu uniquement chez les virions pleins, c'est-à-dire les particules virales qui ont incorporé le génome, et via les pores présents aux axes de symétrie 5 (Simpson *et al.*, 2002; Tsao *et al.*, 1991; Wu et Rossmann, 1993). Ensuite, lors des étapes précoces d'un nouveau cycle d'infection, cette région est clivée par des enzymes protéolytiques extracellulaires, donnant ainsi naissance à la protéine VP3 de 60 kDa (figure 3) (Paradiso *et al.*, 1984; Weichert *et al.*, 1998).

VP2 ne porte aucun NLS bien qu'elle doive retourner au noyau, site d'assemblage des capsides, suite à sa traduction cytoplasmique. Toutefois, comme mentionné précédemment, elle possède un motif de localisation nucléaire (NLM) qui est formé suite au repliement conjoint de trois protéines structurales. Ce motif est riche en résidus basiques et se trouve à la surface interne des intermédiaires trimériques (Lombardo *et al.*, 2000). Ainsi, il permet la translocation nucléaire des trimères de VP2 ou de VP1 et VP2, à lui seule ou possiblement en collaboration avec des motifs présents dans VP1up respectivement (Lombardo *et al.*, 2000; Lombardo *et al.*, 2002; Riobos *et al.*, 2006). Il est à noter que le NLM n'est pas impliqué dans l'import nucléaire des virions lors des étapes précoces d'infection puisque son positionnement, du côté intérieur des trimères, le rend inaccessible chez les particules virales nouvellement formées.

3.3.2.2 VP1

La protéine VP1 est bien entendu également exprimée de façon tardive. Chez le PPV, elle est constituée de 729 acides aminés et possède une masse moléculaire apparente de 84 kDa (Molitor *et al.*, 1983). Elle constitue la protéine minoritaire de la capsid des parvovirus, c'est-à-dire qu'elle représente environ 10 à 20% de sa composition. Comme précisé antérieurement, VP1 et VP2 sont toutes les deux produites par épissage alternatif du transcrit R4 issu du promoteur p40 (Bergeron *et al.*, 1993). Elles possèdent donc une séquence commune et diffèrent seulement au niveau de leur extrémité N-terminal. En effet, la séquence de VP1 est identique à celle de VP2 à l'exception d'une région de 150 acides aminés, dans le cas du PPV, en N-terminal nommée VP1up (VP1 unique part) (figure 3). Chez certains parvovirus, par exemple le B19, cette région est constamment exposée à la surface de leur capsid. En revanche, chez le PPV et le MVM notamment, elle est localisée à l'intérieur des virions nouvellement produits et est externalisée lors des étapes précoces d'un cycle d'infection subséquent. Plus précisément, c'est l'acidification de la voie

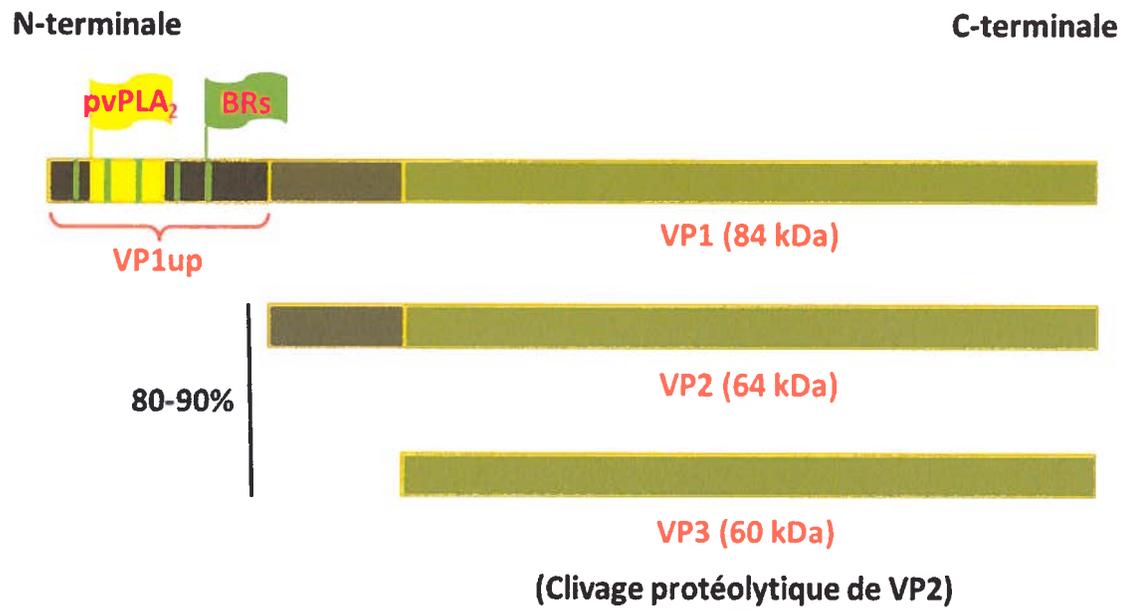
endosomale qui est responsable du changement conformationnel de la capsidie à l'origine de l'exposition de la VP1up (Mani *et al.*, 2006). L'externalisation de cette région est favorisée par le clivage protéolytique de VP2 en VP3 (Farr *et al.*, 2006) et, tout comme pour la région 2Nt, a lieu via les pores présents aux axes de symétrie 5. Finalement, il a été démontré que ce processus peut également être induit *in vitro* par une source d'énergie externe, telle la chaleur (Cotmore *et al.*, 1999).

Des essais de production de capsides à l'aide de système d'expression de VP2 ont démontré que VP1 n'est pas nécessaire à la formation des capsides (Lopez de Turiso *et al.*, 1992; Martínez *et al.*, 1992; Saliki *et al.*, 1992). Aussi, les virions qui possèdent de telles capsides ont la capacité d'incorporer le génome et ne présentent pas de défauts au niveau de l'attachement. Toutefois, ils ne sont pas infectieux (Tullis *et al.*, 1993), d'où l'importance de VP1up dans l'établissement d'une infection productive. Il y a deux caractéristiques qui peuvent possiblement expliquer son importance dans l'infectivité.

Tout d'abord, VP1up possède une activité phospholipase A₂ sécrétée (sPLA₂) qui joue un rôle cruciale dans le cycle viral. En effet, la VP1up de pratiquement tous les parvovirus contient un domaine fortement conservé d'environ 40 acides aminés et notre laboratoire a démontré que quelques résidus de ce domaine correspondent à ceux du site actif des sPLA₂s, une activité qui jusqu'à présent, n'était pas connue pour exister dans la capsidie d'un virus (figure 3).

La deuxième caractéristique qui pourrait justifier l'importance de VP1up dans l'infectivité est la présence de cinq régions basiques (BR) pouvant potentiellement correspondre à des signaux de localisation nucléaire (NLS) classiques (figure 3).

Figure 3. Protéines structurales du PPV. Les protéines structurales possèdent une séquence commune et diffèrent uniquement au niveau de leur extrémité N-terminal. La capsid est composée à 80 à 90% de la protéine VP2 (64 kDa) et de son produit de clivage, la protéine VP3 (60 kDa). La maturation de VP2 en VP3 est un processus régité par des protéases extracellulaires. La protéine minoritaire de la capsid, VP1 (84 kDa), contient une partie unique (VP1up) non-partagée avec VP2. VP1up est cruciale à l'infectivité, notamment en raison de la présence d'un motif phospholipase A₂ (PLA₂) appelé pvPLA₂ (PLA₂ virale). Aussi, VP1up possède cinq régions riches en acides aminés basiques (BR), correspondant possiblement à des NLSs, qui pourrait également contribuer à son importance dans l'établissement d'une infection productive.



4. Phospholipase A₂

4.1 Rôles

Les premières activités phospholipase A₂ (PLA₂) furent détectées dans le liquide pancréatique et dans le venin de cobra au début du 20^e siècle (Dennis, 1994; Tischfield, 1997). Ces enzymes sont très répandues dans la nature et sont retrouvées autant sous forme intracellulaire qu'extracellulaire (sécritée) (Yu *et al.*, 1990).

Les PLA₂s jouent de nombreux rôles physiologiques mais sont également impliquées dans des processus pathologiques. Ainsi, elles sont importantes au niveau du métabolisme des lipides, de la transduction de signaux et du remodelage des membranes (Dennis, 1997). Aussi, elles induisent la libération de l'acide arachidonique qui est un précurseur de la biosynthèse des eicosanoïdes (Dennis, 1997; Reynolds *et al.*, 1992). Ces derniers sont impliqués dans la pathophysiologie de nombreuses maladies, telles l'hypersensibilité aigüe ainsi que les maladies dégénératives et inflammatoires (Yu *et al.*, 1990).

4.2 Classification

Les PLA₂s forment une superfamille d'enzymes très variées qui inclut cinq familles indépendantes; sécrétées (sPLA₂), cytosoliques (cPLA₂), indépendantes du calcium (iPLA₂), lysosomales (LPLA₂) et acetylhydrolases de déclenchement de facteur de plaquette (PAF-AH). Celles-ci sont définies en se basant sur la masse moléculaire, la séquence en acides aminés, la dépendance au calcium et la localisation intracellulaire. Les enzymes appartenant à la famille des sPLA₂s possèdent toutes des caractéristiques communes qui se résument au fait qu'elles sont extracellulaires, qu'elles possèdent de nombreux ponts disulfures, qu'elles sont de faibles poids moléculaire, environ 14 kDa, et qu'elles sont dépendante du calcium. Cette famille est elle-même divisée en trois principaux groupes. À titre

d'exemples, les sPLA₂s pancréatiques des vertébrés et celle du venin de cobra appartiennent au groupe I, les sPLA₂s du venin de vipère et du liquide synovial appartiennent au groupe II et finalement, la sPLA₂ du venin d'abeille appartient au groupe III. Les membres du groupe I et II ont une structure tridimensionnelle (3D) similaire qui est différente de celle des membres du groupe III (Burke et Dennis, 2009; Dennis, 1997).

4.3 Liaison du substrat

La digestion des lipides a lieu à l'interface de l'eau et des lipides puisque ceux-ci sont hydrophobes contrairement à l'enzyme qui est hydrophile (figure 4a). La liaison au substrat a lieu grâce à un canal hydrophobe situé dans le site actif. Un seul phospholipide peut accéder à la fois à ce canal, qui est formé en partie par des acides aminés hydrophobes de la région N-terminal (figure 4b). D'ailleurs, cette région subit des changements de conformation, tout d'abord suite à la liaison avec une micelle de phospholipides puis lorsque le substrat interagit avec le site actif, qui permettent d'activer l'enzyme (figure 4a et b) (Lambeau *et al.*, 1995; Tseng *et al.*, 1996).

4.4 Réaction enzymatique

Les PLA₂s hydrolysent en position 2 du lien ester (*sn*-2) une chaîne d'acide gras d'un phospholipide libérant ainsi un acide gras libre et une molécule de lysophospholipide (figure 4c). Plus précisément, on retrouve dans le site actif un complexe histidine-aspartate-calcium et une molécule d'eau, en plus du canal hydrophobe. Suite à la liaison du substrat au niveau de ce canal, l'histidine, l'acide aspartique et la molécule d'eau forme la triade catalytique qui active une seconde molécule, celle-ci pouvant alors attaquer le lien ester. Le calcium va quant à lui stabiliser la réaction en polarisant l'oxygène (figure 4d) (Renetseder *et al.*, 1985).

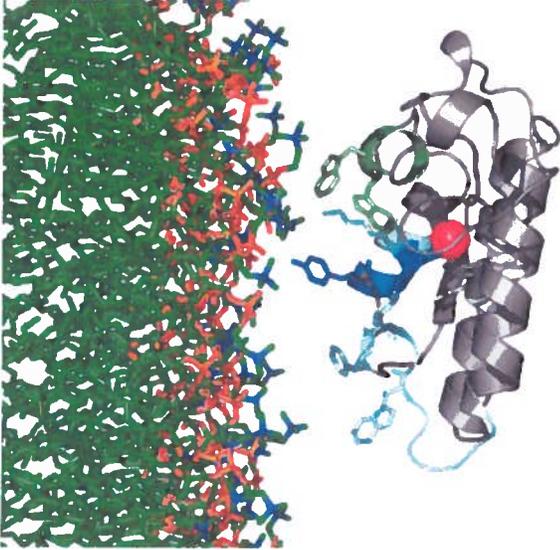
4.5 Acides aminés importants du site actif

Plusieurs acides aminés sont très conservés parmi toutes les PLA₂s. Ces résidus appartiennent au site actif donc au site catalytique, à la boucle de liaison au calcium et au site de liaison au substrat. Il s'agit entre autres d'une histidine, de deux acides aspartiques, d'une leucine et de nombreuses cystéines responsables de la formation de ponts disulfures.

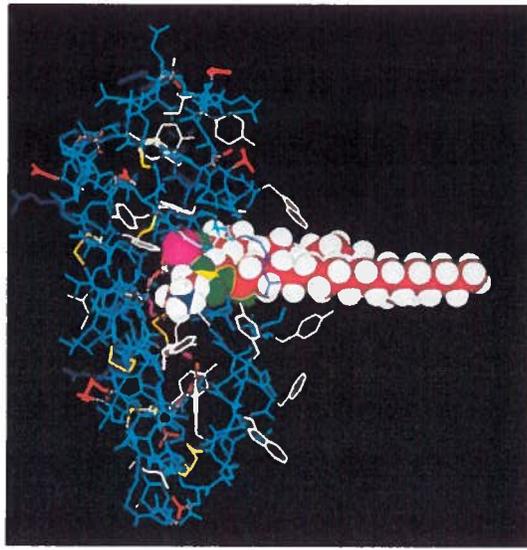
L'histidine ainsi que l'un des acides aspartiques jouent un rôle primordial au niveau de la réaction chimique catalysée par l'enzyme. En effet, ces deux résidus forment la triade catalytique, avec une molécule d'eau, permettant l'activation d'une seconde molécule d'eau responsable de l'hydrolyse du lien ester. L'aspartate est également important pour la conformation de l'enzyme puisqu'une mutation entraîne une modification locale de la structure. Par contre, ceux-ci ne sont pas importants pour la liaison de l'enzyme avec l'interface, l'interaction avec le substrat et la liaison au calcium (Sekar *et al.*, 1997). L'autre acide aspartique est essentiel pour la liaison au calcium bien qu'il ne soit pas crucial pour l'intégrité de la structure et la stabilité conformationnelle de l'enzyme (Li *et al.*, 1994). La leucine se trouve également dans la région de la boucle de liaison au calcium mais joue plutôt un rôle dans l'interaction avec le substrat (Lambeau *et al.*, 1995). Finalement, les PLA₂s possèdent plusieurs cystéines qui établissent des ponts disulfures. Ceux-ci sont cruciaux pour l'intégrité et la stabilité de la structure de l'enzyme (Zhu *et al.*, 1995).

Figure 4. Activité phospholipase A₂. **A.** Modèle de la liaison des PLA₂s du groupe IA (sPLA₂s) à la surface lipidique. Les résidus liant la surface interfaciale, la tyrosine-3, les tryptophanes-19 et -61 et la phénylalanine-64, sont démontrés sous la forme de bâtonnets. **B.** Modèle de la liaison du substrat dans le site actif des PLA₂s du groupe IA (sPLA₂s). Une seule molécule de phospholipide peut accéder à la fois au site actif. Les résidus du site actif, l'histidine-48 et l'acide aspartique-93, et le Ca²⁺ sont démontrés en mauve. Le Ca²⁺ est lié par l'acide aspartique-49 ainsi que par les oxygènes carbonyles de la tyrosine-28 et des glycines-30 et -32. Les résidus aromatiques sont démontrés en blanc. Tiré de (Burke et Dennis, 2009). **C.** Réaction catalysée par les PLA₂s. Les PLA₂s hydrolyse le résidu d'acide gras en *sn*-2 d'un phospholipide ce qui génère un acide gras libre et le lysophospholipide correspondant. **D.** Mécanisme catalytique des PLA₂s. La triade catalytique, formée par une histidine, un acide aspartique et une molécule d'eau, active une seconde molécule d'eau qui peut alors attaquer le carbone carbonyle scissile. Le Ca²⁺ fixe la molécule d'eau activée et stabilise par effet électrostatique l'intermédiaire tétraédrique ainsi formé. Ensuite, l'intermédiaire tétraédrique se décompose pour donner les produits. Tiré et modifié de (Voet et Voet, 2005).

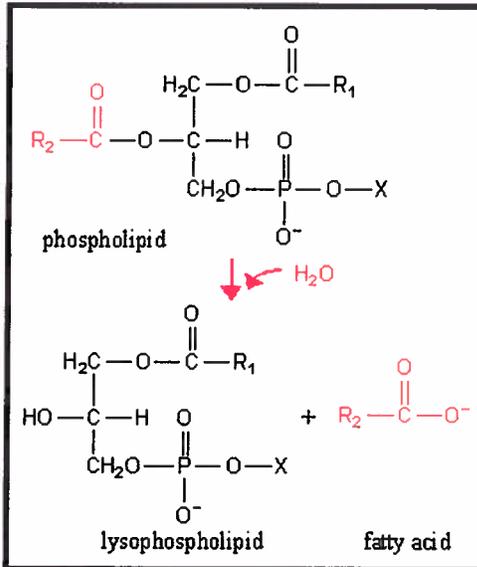
A



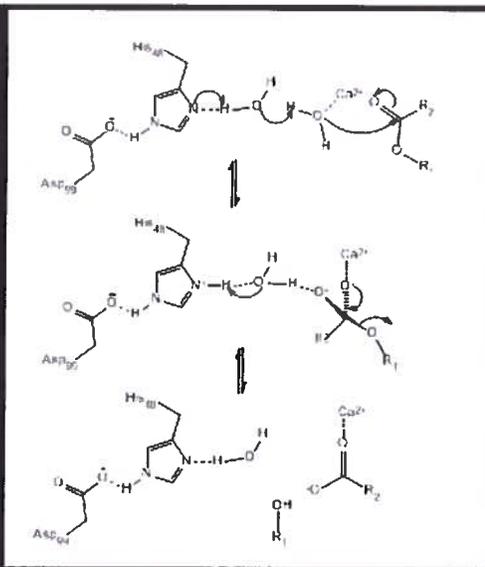
B



C



D



4.6 Phospholipase A₂ virale

La comparaison de la séquence de VP1up avec les séquences de protéines d'une banque de données a permis de démontrer la présence d'une activité PLA₂. Ce domaine enzymatique est fortement conservé au sein de la famille des *Parvoviridae* et porte les motifs consensus de la boucle de liaison au Ca²⁺ (motif YXGXY) et du site catalytique (motif HDXXY) des sPLA₂s (figure 5) (Zádori *et al.*, 2001). La spécificité de substrat de l'enzyme virale (pvPLA₂) est très similaire à celle des sPLA₂s. En effet, la pvPLA₂ hydrolyse toutes les classes majeures de glycérophospholipides excepté le phosphatidylinositol. Aussi, son activité enzymatique est très importante, de l'ordre de celle des PLA₂s les plus actives, quoiqu'elle varie largement entre les divers parvovirus (Canaan *et al.*, 2004).

Cinq acides aminés du site actif de la pvPLA₂ ont été identifiés, il s'agit d'une proline en position 21, hautement conservée entre la pvPLA₂ des différents parvovirus mais pas avec les sPLA₂s, faisant partie de la boucle de liaison au calcium, d'une histidine en position 41, d'un acide aspartique en position 63, ces deux derniers acides aminés sont responsables de la diade catalytique, et finalement, de deux autres acides aspartiques en position 35 et 42, tous deux importants pour le positionnement de la boucle de liaison au calcium. La substitution de l'un de ces résidus entraîne l'abolissement de l'activité lipolytique et de l'infectivité, d'où l'importance de la pvPLA₂ dans l'établissement d'une infection productive (Zádori *et al.*, 2001). La pvPLA₂ joue un rôle au cours des étapes précoces de l'infection, soit ultérieurement à l'internalisation mais préalablement à la réplication de l'ADN viral (Canaan *et al.*, 2004; Zádori *et al.*, 2001). Plus précisément, il a été démontré qu'elle est absolument requise pour l'évasion des vésicules de la voie endosomale (Farr *et al.*, 2005; Suikkanen *et al.*, 2003). Il est également possible qu'elle permette l'entrée au noyau en induisant une ouverture dans l'enveloppe nucléaire.

Bien que la pvPLA₂ soit apparentée aux sPLA₂s, de nombreuses différences les distinguent. Tout d'abord, la séquence à l'extérieur du site catalytique et de la boucle de liaison au calcium est pauvrement conservée entre la pvPLA₂ et les groupes de sPLA₂s. De plus, la pvPLA₂ ne possède aucun pont disulfure, ce qui représente une différence structurale majeure comparée aux sPLA₂s. Aussi, l'analyse de la structure 3D prédite de la pvPLA₂ du PPV/B19, obtenue à partir de l'homologie de séquences entre celles-ci et les sPLA₂s, a permis de constater que la séquence reliant les deux hélices formant le site catalytique est plus courte chez la pvPLA₂ que chez les sPLA₂s. Finalement, parmi neuf inhibiteurs connus des sPLA₂s, seulement quelques-uns démontrent une activité inhibitrice sur la pvPLA₂ et avec un faible potentiel, ce qui signifie que la structure du site catalytique est différente de celle des sPLA₂s (Canaan *et al.*, 2004; Zádori *et al.*, 2001).

Étant donné son rôle primordial dans l'infectivité et les caractéristiques qui la différencient des PLA₂ sécrétées (sPLA₂), nous désirions élucider sa structure tridimensionnelle par résonance magnétique nucléaire (RMN).

Figure 5. Alignement de séquences de motifs PLA₂s de parvovirus et de sPLA₂s représentatives. Les séquences des parvovirus et des sPLA₂s avec les numéros d'accèsion de GenBank (excepté ceux qui ne sont pas encore déposés) sont séparées par la numérotation structurale commune pour les sPLA₂s des groupes I/II. La boucle de liaison au Ca²⁺ est soulignée par des carrés pleins et les résidus du site catalytique par des cercles pleins. Les parvovirus d'invertébrés sont indiqués par DNV et par le nom de leur hôte : *Gm*, *Galleria mellonella*; *Ml*, *Mythimna loreyi*; *Jc*, *Junonia coenia*; *Pi*, *Pseudoplusia includens*; *Ds*, *Diatraea saccharalis*; *Cp*, *Culex pipiens*; *Ce*, *Casphalia extranea*; *Ad*, *Acheta domesticus*; *Pf*, *Periplaneta fuliginosa*; *Bm*, *Bombyx mori*. Les parvovirus de vertébrés sont indiqués par PV. K. Rat, kilham rat; MVM, minute virus of mice; Mduck, muscovy duck; Rh/Macaq., rhesus-macaque monkeys; AAV, adeno-associated virus. Les parvovirus Lull et H1 proviennent de cultures tissulaires et le B19 est un parvovirus humain. Les sPLA₂s représentatives sont indiquées par le numéro de groupe : IA, PLA₂ venin de serpent *Naja naja*; IB, PLA₂ pancréas humain; IIA, PLA₂ liquide synovial humain; IIB, PLA₂ venin de serpent vipère du Gabon; IIC, PLA₂ rat; III, PLA₂ venin d'abeille; V, PLA₂ humaine; X, PLA₂ humaine. Surlignage vert foncé, 100% d'identité; surlignage vert pâle, au moins 70% de conservation parmi toutes les PLA₂s. Surlignage rouge foncé et rouge pâle indique 100% d'identité et au moins 70% de conservation, respectivement, parmi les pvPLA₂s. Surlignage bleu foncé et bleu pâle indique 100% d'identité et au moins 70% de conservation, respectivement, parmi les sPLA₂s. Surlignage jaune indique les résidus conservés chez les parvovirus de vertébrés [acides aminés conservés: (L, V, I), (Y, W, F), (R, K)]. Tiré de (Zádori *et al.*, 2001).

```

Gm DNV 177 : LTVPGYKYLGGNSLN---RGQPTNQIDEDAKENDEAYDKVKT----SQEVSRAQNTFVNK : 230 (AAA66966)
M1 DNV 177 : LTVPGYKYLGGNSLN---RGQPTNQIDEDAKENDEAYDKAKT----SQEVSRAQNTFVNK : 230
Jc DNV 177 : LTVPGYKYLGGNSLN---RGQPTNQIDEDAKENDEAYDKAKT----SQEVSRAQNTFVNK : 230 (Q90053)
Pi DNV 177 : LTVPGYKYLGGNSLD---RGEPVNIIDADAKENDEAYDKAKT----SQEVSRAQNTFVNK : 230
Ds DNV 177 : LTVPGYKYLGGNSLN---RGPPTNEIDADAKENDEAYSQSKT----AQEVSRAQNTFVNK : 230 (AAC18002)
Cp DNV 140 : LVPAPYKYAGGNSLN---RGPAYDLVDESARQHIIAYDKAKS----PEDIHKAQRQFLTE : 193
Pf DNV 149 : LTYPFHHYLGPGNSLD---NNEPVDRDDAIEEENKAYANAKS----SIDVINADKKAIDH : 202 (AAF04300)
Ad DNV 178 : AVLPGTDFVGGNPID---PKPARSETDQIAKENHDLGYEDLLHRA--KSQYFTEEDFKTEVY : 234
Ce DNV 4 : IHFPYHNYLGGSDNF---KKQPVDEDDAIAIRHDLQYDKASSDKDIFKADKQARIEFFSSF : 62 (AF375296)
Bm DNV 4 : IHFPYHNYLGGTDNF---EKNPVDEDDAIAIRSHDLAYDKVTNHKEVFQADKQARIEFFTSF : 62 (AY033435)
Canine PV 33 : LVPPGYKYLGGNSLD---QGEPTNPSDAAAKENDEAYAAYLRSKGKNPYLYFSPAQRFFIDQ : 91 (VCPVCP)
Mink PV 7 : LVPPGYKYLGGNSLD---QGEPTNPSDAAAKENDEAYAAYLRSKGKNPYLYFSPAQRFFIDQ : 65 (VCPVME)
Mouse1 PV 7 : LVPPGYKYLGGNSLD---QGEPTNPSDAAAKENDEAYAAYLRSKGKNPYLYFSPAQRFFIDQ : 65 (AAA61406)
Feline PV 12 : LVPPGYKYLGGNSLD---QGEPTNPSDAAAKENDEAYAAYLRSKGKNPYLYFSPAQRFFIDQ : 70 (AAC37928)
MVM PV 1 : MVPPGYKYLGGNSLD---QGEPTNPSDAAAKENDEAYDQYIKSGKNPYLYFSPAQRFFIDQ : 59 (VCPVIM)
LuIII PV 12 : WVPPGYKYLGGNSLN---QGEPTNPSDAAAKENDEAYDQYIKSGKNPYLYFSPAQRFFIDQ : 70 (M81888)
H1 PV 12 : WVPPGYKYLGGNSLD---QGEPTNPSDAAAKENDEAYDQYIKSGKNPYLYFSPAQRFFIDQ : 70 (P03136)
K.Rat PV 12 : CVPPGYKYLGGNSLD---QGEPTNPSDAAAKENHDLAYDEYIKSGKNPYLYFSPAQRFFIDQ : 70 (AAB38327)
Porcine PV 11 : LTLPGYKYLGGNSLD---QGEPTNPSDAAAKENDEAYDKYIKSGKNPYLYFSPAQRFFIDQ : 69 (VCPVNA)
MDuck PV 53 : FVLPGYKYLGGNSLD---KGPVNVKASVLALEHDKAYDQQLKAGDNPYIKFNHAAQDFIDS : 111 (CAA52984)
Goose PV 53 : FVLPGYKYLGGNSLD---KGPVNVKASVLALEHDKAYDQQLKAGDNPYIKFNHAAQDFIDS : 111 (AAA43230)
AAV2 PV 45 : LVLPGYKYLGGNSLD---KGEVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLYFNHAAEFQER : 103 (AAC03780)
AAV3B PV 45 : LVLPGYKYLGGNSLD---KGEVNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLYFNHAAEFQER : 103 (AAB95452)
AAV4 PV 44 : LVLPGYKYLGGNSLD---KGEVNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLYFNHAAEFQER : 102 (AAC58045)
AAV5 PV 44 : LVLPGYKYLGGNSLD---KGEVNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLYFNHAAEFQER : 102 (CAA77024)
AAV6 PV 45 : LVLPGYKYLGGNSLD---KGEVNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLYFNHAAEFQER : 103 (AAB95450)
Bovine PV 13 : LTLPGYNYLGGNSLF---AGAPVNVKADAAARKHIDFGYSDLLKEGKNPYLYFNTHAQNLIDE : 71 (VCPV85)
Simian PV 158 : LTLPFSNYLGGNSLQ---AGNPQSVVDAARIDHFRYSELIKLGINPYTHWSVADELHNN : 216 (AAA74974)
Rh/Macaq. PV125 : LTLPLTHYLGPNLQ---AGSPTDVAIAAIRIDHFRYSELIKLGINPYTHWTVADDELHNN : 183 (AAF61214)
Chipmunk PV 166 : IHLPPDRYLGPNLE---NGPPVDPVDAARIDHFRYADLEKQGINPYTYTIADELHNN : 224 (AAB82734)
B19 PV 123 : VQLPGTNYVGGNSLQ---AGPPQSAVUSAARIDHFRYSQLAKLGINPYTHWTVADDELHNN : 181 (VCPV19)
30 40 50 100
PLA2 IA 47 : DFADYGCYCGGGSG-----TPVDDLDRCCQVHDCYNEA (X33) AVDCRLAAIC : 126 (I51017)
PLA2 IB 43 : EYNYGCGYCGGGSG-----TPVDELKCCQVHDCYDQA (X38) FLECCRNAAIC : 127 (NP_000919)
PLA2 IIA 40 : SYGYGCHCGGGSG-----SPKDATDRCCVTHDCYKRL (X31) QLECCKAAATC : 117 (PSHUYF)
PLA2 IIB 18 : DYIYGYCCHGGGSG-----KPIDATDRCCFVHDCYGKM (X28) ELCECCRVAATC : 92 (PSBGA)
PLA2 IIC 48 : SYYGCGYCGGGSG-----IPVDATDRCCWADHCCYHKL (X35) KACECCKLSVYC : 129 (B54762)
PLA2 III 29 : IYYPGTLCCHGNKSSGNELGRFKHTDAACRTHDCYPDVM (X17) LSCDCEDKFDYC : 98 (P00630)
PLA2 V 40 : NYGYGCGYCGGGSG-----TPKDGTLWCWADHCCYGRLL (X30) NLCAECRKLVCYC : 117 (NP_000920)
PLA2 X 61 : AYMKYGCGYCGGGSG-----QPRDAITLWCCHGNCCYTRA (X31) LLLCCDQEIANC : 139 (NP_003552)

```

4.6.1 Principe de la résonance magnétique nucléaire

L'objectif de la résonance magnétique nucléaire (RMN) est l'identification de la structure de composés par obtention d'informations sur l'environnement nucléaire. Il s'agit d'une technique de spectroscopie, reposant sur le magnétisme nucléaire, appliquée aux atomes de spin nucléaire non nul. Le spin nucléaire atomique ou autrement dit, le moment magnétique intrinsèque, définit la rotation du noyau autour de son axe. Les atomes possédant un noyau composé d'un nombre pair de protons et de neutrons ont un spin nul tandis que ceux dont le noyau est composé d'un nombre impair de protons et/ou de neutrons ont un spin non nul. Par exemple, le carbone possède un moment magnétique total nul, contrairement à son isotope, le carbone¹³, et à l'hydrogène qui possèdent plutôt un moment magnétique total intrinsèque. C'est pourquoi ces derniers sont couramment utilisés pour la résonance magnétique nucléaire. Il est aussi important de mentionner que pratiquement tous les éléments du tableau périodique possèdent des isotopes stables actifs en RMN. Par contre, il est évident que leur abondance naturelle est un critère primordial pour mener une expérience de RMN. L'existence d'un moment cinétique pour le noyau rend celui-ci semblable à une charge électrique en rotation et lui confère en quelque sorte les caractéristiques d'un petit solénoïde. Il se comporte alors comme un dipôle magnétique pouvant interagir avec un champ magnétique externe.

La RMN consiste à modifier le moment magnétique nucléaire grâce à l'influence de champs magnétiques externes. À l'état de repos, l'orientation des spins est aléatoire. La résultante magnétique de l'ensemble est donc nulle. Les atomes possédant un moment magnétique peuvent interagir avec un champ magnétique extérieur. Ainsi, lorsque des noyaux de spins non nul sont soumis à un premier champ magnétique B_0 produit par un aimant, les différents spins vont se répartir en deux groupes, ceux qui adoptent le sens du champ et ceux qui adoptent le sens contraire, la majorité adoptant le sens parallèle. À chacune de ces orientations correspond un niveau d'énergie, le sens parallèle étant de plus

basse énergie. À ce moment, le système est à l'équilibre. Pour observer un signal, il faut rompre cet équilibre en peuplant le niveau énergétique supérieur. L'échantillon est alors soumis à un second champ magnétique produit par une source de radiations électromagnétique. À ce moment, les noyaux de spins non nul vont absorber les photons qui constituent ce champ magnétique au moment où l'énergie des photons correspond à l'énergie de transition d'un niveau d'énergie à l'autre (fréquence de Larmor), il y a alors résonance. La résonance correspond donc à l'orientation, suite à un passage à un niveau énergétique plus élevé sous l'influence de champs magnétiques, des spins dans le sens antiparallèle de l'axe de ce champ. De façon imagée, on peut se représenter la résonance comme si les photons faisaient « basculer » le spin du noyau d'une orientation à une autre. Après avoir absorbé l'énergie, les noyaux atomiques réémettront une radiation de radiofréquences et retourneront à leur état initial de moindre énergie.

Comme l'énergie des photons d'un champ électromagnétique est directement dépendante de la fréquence de ce champ, on peut caractériser l'énergie de transition du moment magnétique de spin nucléaire en donnant la fréquence de l'onde électromagnétique qui permet la résonance. On parle donc de fréquence de résonance. La fréquence de résonance est influencée par l'environnement local de l'atome dans la protéine, c'est-à-dire, la proximité et la nature des atomes voisins. Dans la réalité, le champ imposé B_0 est modulé localement par l'environnement électronique du noyau ce qui fait que les noyaux résonnent à des fréquences différentes, dépendant de leur environnement électronique. En effet, la présence du nuage électronique constitue un blindage électronique qui atténue légèrement le champ magnétique B_0 auquel le noyau aurait du être soumis. Plus le blindage est intense (σ élevé), plus le proton doit être soumis à un champ fort pour que se produise la résonance. Ainsi, la fréquence de résonance va fournir des renseignements précieux sur l'environnement nucléaire des atomes pouvant être étudié en RMN et donc sur la structure de la molécule. Afin d'obtenir des données indépendantes de l'amplitude du champ magnétique,

qui est difficile à mesurer avec exactitude, les fréquences de résonance seront plutôt converties en déplacement chimique et ce, en obtenant la différence relative entre la fréquence de résonance de l'atome étudié et de celle du noyau de référence. Finalement, c'est l'analyse du spectre de déplacements chimiques qui permet d'obtenir des renseignements détaillés sur la structure de la molécule. Une des premières étapes dans la résolution de sa structure consiste à attribuer les résonances, c'est-à-dire à établir une corrélation entre les signaux du spectre et les atomes étudiés de la molécule. Différentes techniques ont été mise au point pour y arriver, par exemple l'expérience de corrélation par les couplages scalaires (HOHAHA ou TOCSY) et l'expérience de corrélation à travers l'espace par effet Overhauser (NOESY). Ces informations sont introduites dans des programmes de modélisation moléculaire pour rechercher une ou plusieurs conformations de la molécule compatibles avec les données. Ainsi, plusieurs modèles sont obtenus et plus ceux-ci sont similaires, meilleure est la résolution.

5. Signaux de localisation nucléaire

5.1 Rôle

Dans les cellules eucaryotes, les échanges entre le cytoplasme et le noyau se font via les complexes du pore nucléaire (NPC) présents dans la double membrane délimitant le noyau. Ceux-ci comportent un canal constitutionnel de huit à neuf nanomètres de diamètre permettant la diffusion passive de solutés et de petites protéines. Néanmoins, le tunnel peut s'élargir et ainsi atteindre une capacité maximale de 40 nm afin d'accommoder les molécules de masse moléculaire supérieure à environ 50 kDa. Ces dernières nécessitent une étiquette d'importation nucléaire appelée signal de localisation nucléaire (NLS) pour assurer leur internalisation. En effet, ces séquences sont reconnues par des protéines de transport qui facilitent leur translocation nucléaire active. En général, les NLSs opèrent via la voie classique de transport nucléaire, impliquant les récepteurs de la famille des karyopherins, bien qu'il existe de nombreuses voies alternatives (Sorokin *et al.*, 2007).

5.2 Voie classique d'importation nucléaire

La reconnaissance de la séquence du NLS par l'importine- α initie le processus d'importation nucléaire. L'interaction du récepteur avec son substrat peut être directe ou via une protéine adaptatrice. Par la suite, l'importine- α dimérise avec l'importine- β puis le complexe d'importation se localise à l'enveloppe nucléaire. À cet endroit, il va lier le Ran-guanosine diphosphate (GDP) et un cofacteur de transport associé, le NTF2, et va s'arrimer au NPC pour enfin être transloqué à travers le canal central du pore. Dans le nucléoplasme, le RanGEF (Ran guanosine exchange factor) déstabilise et dissocie de façon allostérique le complexe d'importation en échangeant le GDP associé-Ran contre du guanosine triphosphate (GTP). L'importine- α est recyclée vers le cytoplasme grâce à la CAS (cellular apoptosis susceptibility protein). Quant à elle, l'importine-

β est transportée séparément en association avec le RanGTP. Pour compléter le cycle, la RanGAP (Ran-guanosine triphosphatase activating protein) cytoplasmique active l'activité d'hydrolyse du GTP intrinsèque à Ran pour former du RanGDP, ce qui cause la relâche du récepteur. Ainsi, un cycle subséquent d'importation nucléaire peut débiter (Faustino *et al.*, 2007).

5.3 Types

5.3.1 Classiques

Les NLSs les plus souvent rencontrés correspondent à une courte séquence en acides aminés basiques en un seul domaine comparable à la séquence PKKKRKV qui a été décrite originalement pour l'antigène grand T du virus simien 40 (SV40). On peut également retrouver une séquence apparentée comportant deux suites plus courtes de résidus basiques séparées par un petit espaceur de composition variable, dont le prototype est la séquence KR-10aa-KKKL de la nucleoplasmine du *Xenopus*. On parle alors de NLSs classiques monopartites et bipartites, respectivement (Sorokin *et al.*, 2007).

5.3.2 Non-classiques

Il existe aussi des NLSs moins fréquemment rencontrés. Ceux-ci ne présentent pas de consensus et sont de complexité plus grande. À titre d'exemples, la ribonucléoprotéine (hnRNP) K possède une séquence d'importation (et d'exportation) nucléaire non-conventionnelle, nommée le domaine KNS (hnRNP K nuclear shuttling), qui opère via une voie alternative. Pour sa part, la hnRNP A1 comporte une région de 38 acides aminés riche en glycines et en résidus aromatiques, le domaine M9, qui permet son import (et son export) nucléaire actif grâce à une nouvelle voie impliquant la transportine. On parle alors de NLSs non-classiques (Michael *et al.*, 1997).

5.4 Signaux de localisation nucléaire de VP1up

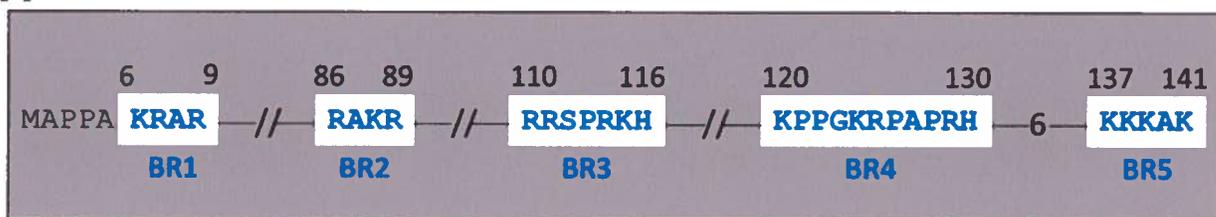
La VP1up comporte de nombreuses régions riches en résidus basiques qui agissent en tant que NLSs. Par contre, leur activité de transport nucléaire respective diffère d'un parvovirus à l'autre (Lombardo *et al.*, 2002; Vihinen-Ranta *et al.*, 2002). Chez le MVM, VP1up possède quatre groupes d'acides aminés basiques, BC1 à BC4 (basic cluster). Les BC1 et BC2, en collaboration avec le NLM de VP2, suffisent pour l'import nucléaire des sous-unités de VP1 exprimées seules. À noter que le BC1 et le NLM se comportent comme des domaines de localisation nucléaire majeurs tandis que le BC2 agit en tant que NLS faible. Ces séquences sont également les seules à être requises pour le transport nucléaire tardif des oligomères de VP1 et VP2, normalement formés en cours d'infection. Cependant, tous les BCs sont requis pour l'infectivité, probablement pour le transport au noyau des particules virales lors des étapes précoces d'infection (Lombardo *et al.*, 2002). La VP1up du CPV porte également de nombreuses régions basiques et l'une d'entre elles, la séquence 4-PAKRARRGYK-13, est l'homologue du BC1 du MVM. Cette dernière agit comme un NLS en induisant l'importation nucléaire d'une protéine hétérologue (Vihinen-Ranta *et al.*, 1997). De plus, cette séquence est cruciale pour le transport au noyau des virions lors des étapes de l'entrée mais inutile à la production de nouvelles particules virales (Vihinen-Ranta *et al.*, 2002). Chez le PPV, VP1up possède cinq régions basiques, BR1 à BR5 (basic region), correspondant potentiellement à des NLSs classiques, monopartites dans le cas des BR1 à BR3 tandis que les BR4 et BR5 pourraient hypothétiquement former un seul NLS bipartite (figure 6a). Les BR1 (6-KRAR-9) et BR2 (86-RAKR-89) sont fortement conservées avec les BC1 (6-KRAKR-10) et BC2 (87-RTKR-90) du MVM respectivement. Aussi, les BR4 (120-KPPGKRPAPRH-130) et BR5 (137-KKKAK-141) sont conservées respectivement avec les BC3 (109-RAGKRTRPP-117) et BC4 (126-RAKKK-130) du MVM, mais avec moins d'homologie. Pour sa part, la BR3 (110-RRSPRKH-116) n'est pas conservée chez le MVM (figure 6b) (Lombardo *et al.*, 2002).

Les BRs pourraient être impliquées dans le transport du virus jusqu'au noyau où celui-ci ou minimalement son génome pourrait entrer via les NPC. Celles-ci pourraient également jouer un rôle lors des étapes plus tardives de l'infection, c'est-à-dire, suite à la transcription et la réplication du génome viral. En effet, elles pourraient collaborer avec le NLM présent dans la région commune à VP2 pour assurer la translocation nucléaire des oligomères de VP1 et VP2 suite à la traduction et la trimérisation cytoplasmiques de ces protéines de manière à permettre l'assemblage des nouveaux virions dans le noyau puis leur relâche.

Ainsi, nous souhaitons tout d'abord évaluer l'activité de transport nucléaire de ces régions pour ensuite déterminer leurs rôles dans le cycle viral.

Figure 6. Régions basiques de la VP1up du PPV. A. Schéma de la disposition des BRs dans la séquence en acides aminés de VP1up. VP1up possède cinq régions basiques, BR1 à BR5. Les résidus composant chacune d'entre elles sont indiqués en bleu. Les BR1 à BR3 correspondent potentiellement à des NLSs classiques monopartites tandis que les BR4 et BR5, séparées par un court espaceur de six acides aminés, pourraient hypothétiquement former un seul NLS classique bipartite. **B.** Alignement de séquences des VP1up du PPV et du MVM. Les résidus composant chacun des groupes d'acides aminés basiques (BC) de la VP1up du MVM sont indiqués en rouge tandis que les résidus composant chacune des régions basiques (BR) de la VP1up du PPV sont indiqués en bleu. Les BR1 et BR2 sont fortement conservées avec les BC1 et BC2 respectivement. Les BR4 et BR5 sont conservées respectivement avec les BC3 et BC4, mais avec moins d'homologie. BR3 n'est pas conservée. Les acides aminés conservés sont soulignés par des étoiles.

A



Bipartite?

B

BC1

MVM, 1 MAPPA**KRAKR**GWVPPGYKYLPGNSLDQGEPTNPSDAAAKEHDEAYDQYIKSGKNPYLYF
 PPV, 1 MAPPA**KRA**-RGLTLPGYKYLPGNSLDQGEPTNPSDAAAKEHDEAYDKYIKSGKNPYFYF
 ***** ** *****

BR1 **BC2**

MVM, 61 SAADQRFIDQTKDAKDWGGKVGHYFF**RTKR**AFAPKLA-TDSEPGTSGV-----
 PPV, 60 SAADEKFIKETEHAKDYGGKIGHYFF**RAKR**AFAPKLSETDS-PTTSQQPEV**RRSPRKH**PGS
 **** * * * * * ***** ***** * * * * *

BC3 **BC4** **BR2** **BR3**

MVM, 108 S**RAGKRT**RPAYIFINQ**AKKK**LTSSAAQSSQT
 PPV, 120 **KPPGKR**P-**APRH**IFINL**AKKAK**GTSNT---NSNS
 *** * * * * * * * * *

BR4 **BR5**

MÉTHODOLOGIE

1. Techniques générales

1.1 Précipitation à l'éthanol de l'ADN

Cette technique est utilisée pour concentrer et/ou purifier l'ADN. Deux volumes d'éthanol 100% et 1/5 volume d'acétate d'ammonium 10 M sont ajoutés à la solution. La précipitation se déroule pendant environ 3 hr ou toute la nuit à -20°C. Par la suite, l'échantillon est centrifugé 15 min à 21 000 x g (RCF) puis le culot d'ADN est lavé avec 500 µL d'éthanol 70% par centrifugation de 5 min à 21 000 x g. L'ADN est séché à 37°C jusqu'à évaporation de l'éthanol, c'est-à-dire durant environ 1 hr. Finalement, l'ADN est resuspendu dans de l'eau distillée.

1.2 Électrophorèses

1.2.1 Électrophorèse sur gel d'agarose

Cette méthode est utilisée pour séparer les fragments d'ADN en fonction de leur poids moléculaire. D'ailleurs, celui-ci peut être estimé grâce à l'utilisation d'un standard (100 pb et/ou 1 kb, Gibco® BRL), composé de fragments d'ADN de taille connue. Pour un gel de 0,8% d'agarose, il faut peser 0,8 g d'agarose et ensuite le dissoudre dans 100 mL de tampon TAE (40 mM Tris, 1mM EDTA (acide éthylènediaminotétraacétique sel disodique) pH 8,0, 0,114% [v/v] d'acide acétique glacial) dans un erlenmeyer. Par la suite, celui-ci est placé dans un four à micro-ondes pour 2-3 min à la puissance maximale et la solution est agitée après chaque minute. Celle-ci est refroidie puis coulée dans un moule approprié et un peigne, possédant le nombre de puits désirés, est déposé. Une fois polymérisé, le gel est placé dans un bain contenant le volume de tampon TAE nécessaire pour faire circuler le courant à travers le gel. Du tampon de chargement de migration 6X (0,25% de bleu de bromophénol, 0,25% de xylène cyanol FF, 30% de glycérol) est ajouté aux échantillons d'ADN de manière à ce que la concentration finale soit de 1X. La migration des échantillons se fait à

100V durant environ 45 min. Enfin, le gel est coloré à l'aide d'une solution de bromure d'éthidium durant environ 15 min puis révélé sur un trans-illuminateur ultra-violet (UV).

Cette technique est aussi réalisée afin de purifier/isoler de l'ADN lors des clonages sauf que dans ce cas, le gel est moins concentré (0,6% d'agarose) et la migration est plus lente (75V) et plus longue (environ 1h30). Par la suite, les bandes d'ADN correspondant au vecteur et à l'insert sont découpées et chacune d'entre elles est transférée dans un microtube. Celles-ci sont alors purifiées grâce à la trousse Miniprep ExpressTM Matrix de Qbiogene selon le protocole expliqué dans la section Extraction d'ADN-Mini-préparation d'ADN. Toutefois, l'ajout de la matrice, 1 mL plutôt que 500 μ L, est suivi d'une incubation d'environ 5 min à 65°C afin de permettre la fusion de l'agar et l'élution à lieu dans 200 μ L d'eau distillée. En dernier lieu, l'ADN est précipité à l'éthanol puis solubilisé dans 10 μ L.

1.2.2 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) en conditions dénaturantes (SDS; sodium dodecyl sulfate) permet la séparation de protéines selon leur masse moléculaire. Tout comme pour les gels d'ADN, un marqueur de poids moléculaire (Broad Range, Bio-Rad) est utilisé de manière à évaluer la masse de protéines cibles. Tout d'abord, pour la préparation du gel de séparation d'une concentration d'acrylamide de 12%, on mélange 2,4 mL d'une solution 30% d'acrylamide, 1,5 mL du tampon «du bas» (4X) (Tris-HCl/SDS pH 8,8 (1,5 M tris-HCl, 0,4% [p/v] dodecyl sulfate de sodium (SDS), pH 8,8)) puis 2,1 mL d'eau distillée. Ensuite, les agents polymérisateurs sont ajoutés, soit 60 μ l d'une solution fraîche 10% de persulfate d'ammonium (APS) et 8 μ l de N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine (TEMED). La solution est alors bien mélangée et le gel est rapidement coulé dans un moule préalablement monté et dont les vitres

ont bien été nettoyées à l'éthanol 70%, la hauteur du gel devant être d'environ 2,5 cm. De l'eau distillée est par la suite ajoutée tranquillement sur le dessus du gel afin d'obtenir une surface uniforme puis environ 30 min sont requises pour la polymérisation du gel. En deuxième lieu, pour la préparation du gel de concentration à 5% d'acrylamide, il faut mélanger 420 μL de la solution 30% d'acrylamide, 625 μL du tampon «du haut» (4X) (Tris-HCl/SDS pH 6,8 (0,5 M tris-HCl, 0,4% [p/v] dodecyl sulfate de sodium (SDS), pH 6,8)) et 1,460 mL d'eau. Avant d'ajouter les agents de polymérisation, on s'assure que le gel de séparation est bien figé, on retire l'eau du dessus du gel puis le liquide résiduelle est essuyé à l'aide d'un papier wattman. Ensuite, 25 μL d'APS 10% frais et 8 μL de TEMED sont ajoutés puis après avoir bien mélangé, le gel est coulé sur le premier. Enfin, le peigne est déposé et on attend encore une fois une trentaine de minutes pour la polymérisation. En attendant, les échantillons sont préparés comme suit : du tampon de chargement (5X) (0,063 M Tris-HCl, 10% glycérol [v/v], 2% SDS [p/v], 5% 2-mercaptoéthanol [v/v], 0,05% bromophénol bleu [p/v]) est ajouté aux échantillons de manière à ce que la concentration finale du tampon soit de 1X. Ceux-ci sont alors incubés dans de l'eau bouillante durant 5 min afin de dénaturer les protéines. Après avoir centrifugé rapidement les tubes pour récupérer l'eau évaporée, les échantillons sont chargés dans les puits du gel. Ce dernier est immergé dans le tampon d'électrophorèse/SDS (3% Tris-base [p/v], 14,4% glycine [p/v], 1% SDS [p/v]) et soumis à un courant de 200V durant environ 1 hr. Finalement, le gel est coloré à l'aide d'une solution de Coomassie (45% méthanol [v/v], 10% acide acétique glacial [v/v], 0,25% bleu de Coomassie brillant R250 [p/v]). Pour ce faire, il est incubé dans au moins cinq volumes de la solution de coloration pour un minimum de 4 hr à température ambiante sur une plateforme rotatrice. Finalement, le gel est décoloré grâce à une seconde incubation mais, cette fois-ci, dans la solution de décoloration (45% méthanol [v/v], 10% acide acétique glacial [v/v]). La durée d'incubation pour la décoloration peut prendre jusqu'à 8 hr et la solution doit être changée à 3 ou 4 reprises durant le processus.

1.3 Transformation bactérienne

Cette méthode consiste à transférer de l'ADN plasmidique dans les bactéries et elle est effectuée dans le but d'amplifier le matériel génétique introduit. En effet, l'ADN exogène est répliqué de façon autonome et au moins une copie du plasmide est transmise à la cellule fille lors de la division bactérienne. Tout d'abord, les bactéries doivent être rendues électrocompétentes. Pour ce faire, une culture bactérienne est préparée avec 2 mL de milieu LB ou SOB et 4 μ L de tétracycline (5 mg/mL) puis celle-ci est incubée 16 hr à 37°C avec une agitation de 200 rpm. Ensuite, elle est ajoutée à 500 mL de milieu SOB se trouvant dans un flacon Erlenmeyer de 2 litres et on procède à nouveau à une incubation mais, cette fois-ci, à 30°C durant 3-4 hr ou jusqu'à l'obtention d'une densité optique de 0,6 à 600 nm. La culture est alors placée sur glace pour 15 min puis elle est divisée en deux dans des tubes de plastique (Nalgene). Le rotor JA-14 est placé dans la centrifugeuse Beckman et les deux tubes sont centrifugés durant 5 min à 5000 x g. Les culots bactériens sont lavés avec 100 mL d'eau distillée stérile froide chaque puis mélangés ensemble dans un seul tube. Par la suite, celui-ci est centrifugé à nouveau pendant 5 min à 5000 x g et le culot est encore lavé mais avec 200 mL plutôt que 100 mL. Cette étape est répétée une fois et finalement, les bactéries sont resuspendues dans 2 mL de glycérol 10% stérile. La solution ainsi obtenue est séparée en aliquots de 105 μ L dans des microtubes de 1,5 mL et les cellules sont rapidement congelées à -80°C. Environ 20 min plus tard, un tube est décongelé afin de procéder à deux transformations témoin. Plus précisément, on réalise une transformation sans ADN afin de s'assurer que les bactéries ne sont pas résistantes à l'ampicilline (témoin négatif) et une autre avec un plasmide pour évaluer la compétence des bactéries (témoin positif).

Par la suite, les cellules peuvent être transformées par électroporation. 50 μ L de bactéries sont donc décongelées et entre 1 et 10 ng d'ADN est ajouté. Le mélange est transféré dans une cuvette froide (BTX disponible cuvettes, 1 mm) et celle-ci est ensuite placée dans l'électroporateur (BTX ECM 395

Electroporation System). On soumet alors le mélange à un choc de 1,8 kVolts durant 5 millisecondes puis le contenu de la cuvette est étalé sur une gélose LB-agar contenant de l'ampicilline (100 µg/mL), l'antibiotique permettant de sélectionner les colonies qui ont incorporé le vecteur. Enfin, la gélose est incubée durant 16 hr à 37°C ou à 30°C, dans le cas des colonies transformées avec le clone infectieux.

1.4 Extraction d'ADN

1.4.1 Mini-préparation d'ADN

Cette méthode est utilisée dans le but de sélectionner rapidement les clones par digestion enzymatique ou de séquencer l'ADN. Dans une éprouvette de 15 mL, 2 mL de milieu LB avec 100 µg/mL d'ampicilline sont inoculés à l'aide d'une colonie mutante puis le tube est incubé à 37°C ou à 30°C, dans le cas des colonies transformées avec le clone infectieux, durant 16 hr et sous agitation de 200 rpm. La culture est transférée dans un microtube de 1,5 mL et elle soumise à une centrifugation rapide afin de sédimenter les bactéries. Le surnageant est jeté, les cellules sont resuspendues dans 300 µL de la solution I (50 mM de glucose [p/v], 25 mM Tris-HCl [p/v], 10 mM EDTA [p/v], autoclavé) froide contenant 10 µg/mL de RNase A et 300 µL de la solution II (0,2 N NaOH [v/v], 1% SDS [p/v]) est ajouté. Le tube est mélangé par inversion et incubé à température ambiante durant 5 min pour permettre la lyse cellulaire. Ensuite, on ajoute 300 µL de solution III (5 M d'acétate de potassium [p/v], 11,5% d'acide acétique glacial [v/v], pH 5,5) froide et on mélange encore une fois par inversion. Le tube est alors incubé durant 10 min sur glace puis centrifugé à 15 000 x g pendant 15 min de manière à précipiter les débris cellulaires. Enfin, le surnageant contenant l'ADN est récolté.

Dans le cas où les mini-préparations d'ADN sont réalisées afin de sélectionner les clones par digestion avec des enzymes de restriction, 0,8

volume d'isopropanol est ajouté au surnageant et on mélange par inversion. L'ADN est ensuite précipité par centrifugation de 15 min à 21 000 x g puis lavé avec 500 µL d'éthanol 70% par centrifugation de 5 min à 21 000 x g. Le culot d'ADN est séché à 37°C pendant environ 1 hr puis est solubilisé avec 40 µL d'eau distillée.

Pour ce qui est des mini-préparations d'ADN réalisées dans le but de séquencer les échantillons, celles-ci sont purifiées via la trousse Miniprep ExpressTM Matrix de Qbiogene. Ainsi, 500 µL de matrice est ajouté au surnageant, le tout est mélangé vigoureusement par inversion puis le mélange est centrifugé 10 sec à 21 000 x g. Ensuite, le culot est lavé avec 500 µL d'éthanol 80% par centrifugation de 10 sec à 21 000 x g. Le lavage est répété 1-2 fois puis le culot est séché à 37°C jusqu'à évaporation complète de l'alcool, soit environ 1 hr. L'élution a lieu par ajout de 80 µL d'eau PCR et enfin, suite à une centrifugation de 3 min à 14 000 rpm, le surnageant est récupéré. L'ADN est migré sur gel d'agarose afin de vérifier sa pureté et son intégrité et est dosé à l'aide d'un spectrophotomètre à 260 nm de longueur d'onde.

1.4.2 Midi-préparation d'ADN

Cette méthode est utilisée afin d'obtenir une grande quantité d'ADN nécessaire pour les clonages ou pour la transfection de cellules. Tout d'abord, 40 mL de milieu LB avec 100 µg/mL sont inoculés à l'aide d'une colonie mutante puis la culture bactérienne est incubée à 37°C ou à 30°C, dans le cas des colonies transformées avec le clone infectieux, durant 16 hr et sous agitation de 200 rpm. La culture est transférée dans un tube de plastique approprié pour la centrifugeuse Beckman. Le rotor JA-17 est placé dans celle-ci puis la culture est centrifugée durant 5 min à 6 000 x g. Ensuite, le surnageant est jeté puis le culot bactérien est resuspendu dans 4 mL de solution I froide contenant 10 µg/mL de RNase A et 4 mL de solution II sont ajoutés. La solution est mélangée par

inversion et incubée à température ambiante durant 5 min. Le même volume de la solution III froide est alors additionné et la solution est mélangée à nouveau.

Lorsque les midi-préparations d'ADN sont effectuées pour les clonages, la solution est alors incubée sur glace pendant 10 min et on procède à une centrifugation de 15 min à 21 000 x g. On ajoute 5 mL de matrice provenant de la trousse Miniprep ExpressTM Matrix de Qbiogene au surnageant, on mélange vivement par inversion puis le mélange est centrifugé 10 sec à 21 000 x g. Ensuite, le culot est lavé avec 5 mL d'éthanol 80% par centrifugation de 10 sec à 21 000 x g. Le lavage est répété 1-2 fois mais lors du dernier lavage, avant de centrifuger, le mélange est séparé en cinq aliquots de 1 mL dans des microtubes de 1,5 mL. Ensuite, les culots sont séchés à 37°C jusqu'à évaporation totale de l'alcool, soit environ 1 hr. L'élution a lieu par ajout de 200 µL d'eau dans chacun des tubes et finalement, suite à une centrifugation de 3 min à 14 000 rpm, les surnageants sont récupérés et mélangés ensemble, pour un volume final de 1000 µL. On procède à une migration de l'ADN sur gel d'agarose pour s'assurer de sa pureté et de son intégrité et on détermine sa concentration par spectroscopie à 260 nm. Si l'ADN est trop dilué, on procède alors à une précipitation à l'éthanol et on solubilise dans un volume moindre.

En ce qui concerne les midi-préparations d'ADN réalisées pour la transfection de cellules, celles-ci sont purifiées à l'aide de la trousse QIAfilter Plasmid Midi de QIAGEN. Pour ce faire, la solution est aussi incubée durant 10 min mais à température ambiante plutôt que sur glace. De plus, l'incubation a lieu dans une cartouche QIAfilter. En parallèle, une unité de filtration QIAGEN-tip 100 est équilibrée avec 4 mL de tampon QBT puis le lysat cellulaire est filtré à l'intérieur de celle-ci. Après le drainage par gravité, on procède à deux lavages de 10 mL chacun avec le tampon QC. Ensuite, l'élution est effectuée via l'application de 5 mL de tampon QF et l'ADN est précipité grâce à l'ajout de 3,5 mL d'isopropanol suivi d'une centrifugation de 15 min à 21 000 x g. Enfin, le culot d'ADN est lavé avec 2 mL d'éthanol 70% par centrifugation de 5 min à 21 000 x g et séché,

comme décrit précédemment, avant d'être solubilisé dans 100 μL d'eau PCR. Encore une fois, l'ADN est migré sur gel d'agarose et est dosé.

1.5 Sélection des clones par digestion enzymatique

Cette technique a pour objectif de confirmer que l'insert a bel et bien intégré le vecteur lors du clonage. Pour chaque clonage, environ 12 à 24 mini-préparations d'ADN sont réalisées suivant le protocole expliqué précédemment. Ainsi, 5 μL de chacune d'entre elles est mis à migrer sur gel d'agarose avec un témoin négatif consistant à environ 500 ng de vecteur afin de différencier les vecteurs qui se sont refermés sur eux-mêmes de ceux qui contiennent l'insert. 5 μL d'échantillons de cinq clones qui semblent avoir incorporé l'insert ainsi que 5 μL de la mini-préparation d'ADN d'un vecteur qui ne semble pas contenir l'insert sont alors digérés par les deux mêmes enzymes de restriction utilisées pour le clonage en question. Les conditions des réactions sont également les mêmes que pour le clonage à l'exception que les enzymes sont utilisées à raison de 0,5 μL chacune et que le volume réactionnel total est moindre, 10 μL dans le cas où les enzymes sont concordantes, c'est-à-dire nécessitent le même tampon de digestion, et 15 μL lorsqu'elles sont discordantes. Ensuite, les produits sont migrés en totalité sur gel d'agarose. L'analyse du profil des bandes permet alors de sélectionner les clones positifs. Finalement, un ou deux des bons clones sont remis en culture à partir des 0,5 mL du 2 mL de mini-culture restants afin de procéder à nouveau à une mini-préparation d'ADN qui, cette fois-ci, sera utilisée pour le séquençage.

1.6 Séquençage et conservation des clones/mutants

Cette méthode est requise pour vérifier les clones sélectionnés par digestion enzymatique. Aussi, lorsque les clonages consistent à échanger des fragments de même taille, les clones sont sélectionnés de cette façon. Dans le cas de la mutagenèse, le séquençage est habituellement nécessaire pour sélectionner et

vérifier les mutants. Le séquençage a été réalisé par MCLAB et pour chaque échantillon à séquencer, 10 μL de la mini-préparation d'ADN, effectuée selon le protocole décrit préalablement, à 50-100 ng/ μL et 10 μL de l'amorce de séquençage à 5 pmole/ μL leur ont été envoyés.

Suite au séquençage, le restant de la mini-culture du clone ou du mutant choisi est strié à l'aide d'un manche de Koch sur une gélose LB-agar puis celle-ci est incubée à 37°C ou 30°C, pour les clones infectieux, durant 16 hr. Une midi-préparation d'ADN est alors effectuée dans le but de réaliser des clonages subséquents, pour la transfection de cellules et/ou pour la conservation de l'ADN à -20°C. Aussi, 500 μL de la culture utilisée pour l'extraction d'ADN est repris dans 500 μL de glycérol 50% stérile pour conservation à -80°C.

1.7 Mutagenèse

La mutagenèse dirigée permet d'introduire de manière spécifique des mutations dans l'ADN. Au cours de cette étude, elle a été réalisée en utilisant le protocole QuickChange de Stratagene.

Les amorces utilisées, soit sens et anti-sens, comportent la mutation environ au centre, ont une longueur de 25-45 nucléotides, sont d'au moins 40% de G ou de C, se termine par un ou plus de G ou de C et ont un T_m généralement supérieur à 78°C. Les conditions de la réaction sont de : 5 μL de tampon spécifique de la polymérase Pfu Turbo Roche Diagnostic (10X), 1 μL d'ADN polymérase Pfu Turbo (Roche Diagnostic), 1 μL d'amorce sens à 125 ng/ μL , 1 μL d'amorce antisens à 125 ng/ μL , 1 μL de dNTP à 10 mM, 2 μL de matrice (selon le cas) à 10 ng/ μL et 39 μL d'eau PCR, le volume final étant de 50 μL . Quant à lui, le programme est de: un cycle de 30 sec à 95°C suivi de 18 cycles de 30 sec à 95°C, 1 min à 55°C et 3min30 à 68°C. Par la suite, le produit de la réaction est digéré avec 1 μL de *DpnI* (20 U/ μL) pour une durée de 2 hr à 37°C. L'utilisation de *DpnI* permet d'éliminer les brins parentaux d'ADN puisque cette enzyme

coupe, au niveau de la séquence GA^M↓TC, l'ADN méthylé. Enfin, le produit de la digestion est précipité à l'éthanol puis resuspendu dans 10 µL d'eau et 2 µL est utilisé pour transformer des bactéries *E.coli* XL1-Blue.

1.8 Culture cellulaire

1.8.1 Passage des cellules PT

La lignée cellulaire PT (*Porcine Testis*) a été utilisée pour cette étude. Il s'agit d'un clone dérivé de la lignée cellulaire ST (ATCC, CRL-146) très susceptible à l'infection par le PPV. Ces cellules sont cultivées dans du milieu de culture DMEM Gibco[®] BRL (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) additionné de 7% de sérum de veau fœtal inactivé Gibco[®] BRL, de 1% de L-glutamine 200 mM Gibco[®] BRL et de 1% de Pénicilline/Streptomycine Gibco[®] BRL (10 U/µL). La culture se fait à 37°C avec 5% de CO₂.

Lorsque les cellules atteignent une confluence de 75%, le passage des cellules dans un flacon de 75 cm² est effectué sous hôte à flux laminaire. Tout d'abord, le milieu de culture est jeté puis les cellules sont lavées avec 10 mL de PBS Gibco[®] BRL (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*). Ensuite, 2 mL de solution de trypsine 1X (0,01% [p/v] trypsine, 0,04% EDTA [p/v]) est ajouté afin de décoller les cellules. Le flacon est alors incubé durant 5-10 min à 37°C puis 8 mL de milieu est ajouté de manière à inactiver l'enzyme. Les cellules sont resuspendues par aspiration à l'aide d'une pipette et 1 mL de la suspension est repris dans 11 mL de milieu afin d'obtenir une dilution 1:12. Il faut environ 3 jours pour que les cellules soient de nouveau à confluence.

1.8.2 Transfection des cellules PT

Cette méthode permet d'introduire de l'ADN exogène dans les cellules eucaryotes. Lors de ce projet, les transfusions ont été réalisées à l'aide de la

lipofectamine. Premièrement, des midi-préparations d'ADN sont réalisées selon le protocole précédemment expliqué. Les cellules sontensemencées dans une plaque à 24 puits dans laquelle des lamelles rondes en verre ont été préalablement déposées. À noter que les cellules sont directementensemencées dans les puits (sans lamelle) dans le cas de l'IP des capsides pour le qPCR. Plus précisément, 500 μL de suspension cellulaire à $1,4 \times 10^5$ cellules/mL est ajouté à chacun des puits (7×10^4 cellules/puit) et les cellules sont cultivées à 37°C en présence de 5% de CO_2 durant environ 16 hr ou jusqu'à ce que la confluence atteigne 60-70%. Parallèlement, 750 ng d'ADN est doucement mélangé avec du milieu DMEM ne contenant pas de sérum ni d'antibiotique pour un volume final de 50 μL . De plus, 2 μL de lipofectamine™ 2000 Invitrogen est combiné avec 48 μL de milieu DMEM sans sérum et antibiotique puis le mélange est incubé 5 min à température ambiante. Ensuite, l'ADN dilué est doucement mélangé avec la lipofectamine diluée et le tout est laissé reposer à température ambiante durant 20 min. La totalité du mélange (100 μL) est alors déposée dans un puits contenant des cellules dans 500 μL de milieu. La plaque est incubée à 37°C et avec 5% de CO_2 durant 4 hr et, par la suite, le milieu est retiré puis remplacé par du milieu frais contenant du sérum. Enfin, la plaque est incubée de nouveau mais, cette fois-ci, pour une durée de 24 hr ou de 48 hr, selon le cas. Des cellules non-transfectées, autrement dit qui ont subi le même traitement mais en absence d'ADN, sont utilisées en tant que témoin négatif.

1.8.3 Immunofluorescence indirecte

L'immunofluorescence permet de détecter des protéines spécifiques directement dans les cellules. Le milieu de culture (500 μL) est retiré des puits de la plaque à 24 puits et est remplacé par 200 μL de formaldéhyde 3% dans le tampon d'immunofluorescence (PBS 1X, 0,1% Tween 20, 0,1% BSA, 0,02% NaN_3). Cette dernière étape est réalisée durant 30 min à température ambiante et ensuite, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS 1X. Les cellules sont alors perméabilisées par ajout de 200 μL de Triton X-100 3% dans le tampon

d'immunofluorescence. Suite à une seconde incubation de 30 min à température pièce, les cellules sont encore lavées trois fois avec du PBS 1X. En parallèle, les anticorps primaires et secondaires sont dilués dans le tampon d'immunofluorescence. Tout d'abord, 200 μ L de la solution d'anticorps primaires est déposé dans chacun des puits et la plaque est incubée pendant 1 hr, toujours à température pièce, à l'abri de la lumière. Par la suite, les lamelles sont lavées à trois reprises avec du PBS 1X puis 200 μ L du mélange d'anticorps secondaires est ajouté aux cellules. On procède encore à une incubation, sous les mêmes conditions que la précédente, suivie de trois lavages au PBS. Les noyaux sont colorés grâce à une incubation de 30 min à température ambiante et dans le noir en présence de 200 μ L du colorant Hoechst 33258 (2 μ g/mL) qui a une forte affinité pour l'ADN. Après avoir été séchées à l'aide d'un mouchoir, les lamelles sont fixées sur des gouttes de milieu de montage préalablement déposées sur des lames de montage. Finalement, les lamelles sont séchées avant d'être analysées en microscopie à fluorescence. Les lames sont conservées à 4°C dans le noir. À noter que le protocole est le même pour une plaque à 96 puits à l'exception que le volume ajouté des différentes solutions est de 100 μ L.

2. Protocoles section activité phospholipase A₂ sécrétée de VP1up

2.1 Clonage de VP1M33 dans le vecteur d'expression pPAL7

2.1.1 Description de l'insert et du vecteur

Le fragment VP1M33 comporte les 384 nucléotides en 5' du gène de VP1 et code une protéine de 128 acides aminés correspondante au domaine PLA₂ (figure 7a).

Le vecteur d'expression pPAL7 de Bio-Rad a une taille de 5,9 kb et utilise le promoteur T7lac, inductible par l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), afin de fortement exprimer une protéine de fusion Profinity eXact dans des

cellules *E.coli* produisant l'ARN polymérase T7. Ce plasmide exprime constitutivement le répresseur *lacI* et confère une résistance à l'ampicilline à la cellule hôte. L'étiquette d'affinité Profinity eXact™ a une masse moléculaire de 8,2 kDa et fonctionne comme une étiquette de fusion N-terminal. Elle correspond à une forme du prodomaine de la protéase subtilisine BPN' et elle a été conçue afin de contenir, à son extrémité C-terminal, la séquence de reconnaissance de clivage du mutant S189 de cette protéase (EEDKLFKAL). Des fusions précises, ou autrement dit qui génère un produit purifié ne possédant aucun résidu additionnel en N-terminal, sont construites utilisant le site de restriction HindIII ainsi qu'un site de restriction approprié dans le site de clonage multiple (MCS) (figure 8a). Toutefois, chez certaines protéines, les deux premiers acides aminés résultent en une cinétique de clivage non-idéale compromettant l'élution. Pour pallier à ce problème, une séquence de liaison de deux résidus (thréonine-sérine de préférence) est insérée entre l'étiquette et la protéine cible lors de l'étape du clonage, générant ainsi une fusion imprécise. Dans le cas de VP1M33, aucun espaceur n'était requis puisque ses deux premiers acides aminés sont favorables au clivage subtilisine-dépendant lors de la purification.

2.1.2 Optimisation de la séquence de VP1M33

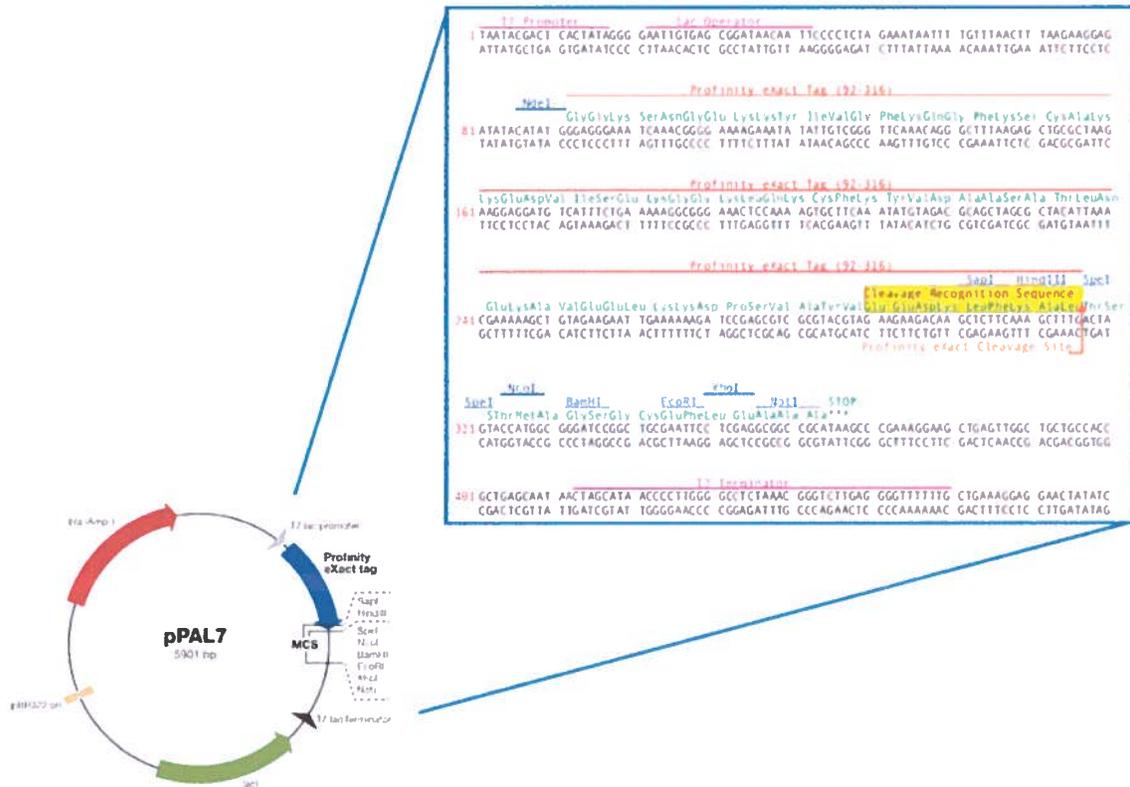
Nous avons fait optimiser la séquence du gène codant pour la région de 175 résidus en N-terminal de VP1 (VP1GS) par GenScript Corp. Plus précisément, les codons associés à des tRNAs rares chez *E.coli* ont été remplacés par des codons préférentiellement utilisés. Le gène optimisé nous a été fourni dans le vecteur pUC57 (figure 7b).

Figure 7. Gène VP1M33. A. Schéma de la région du génome viral codant pour VP1 et VP2. Le gène VP1M33 correspond à un fragment de 384 nucléotides en 5' du gène de ces protéines. Il code une protéine de 128 résidus comprenant le domaine de la phospholipase A₂ virale (pvPLA₂). **B.** Alignement de séquences du gène original et du gène optimisé VP1GS. Ce fragment correspond aux 525 premiers nucléotides en 5' du gène de VP1 et VP2. Il code une protéine de 175 acides aminés incluant toute la partie unique de VP1 (VP1up) en plus d'une petite séquence en N-terminal de VP2. Son gène a été optimisé par GenScript Corp. dans le but de favoriser l'expression en bactéries *E.coli* de VP1M33. Les nucléotides conservés sont soulignés par des étoiles.

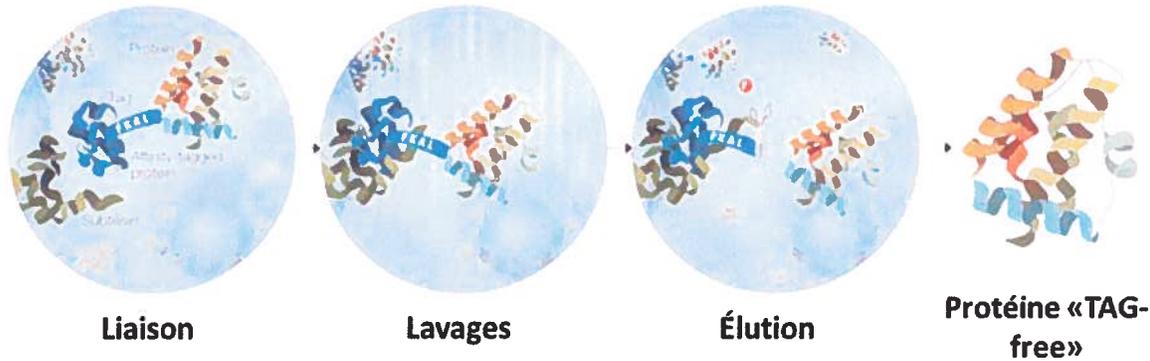
Figure 8. Système de purification de protéines Profinity eXact™ de Bio-Rad.

A. Vecteur d'expression pPAL7. Carte (à gauche) et séquence de la région de clonage et de l'étiquette Profinity eXact™ (à droite) du plasmide pPAL7. Ce vecteur de 5,9 kb permet l'expression de protéines de fusion avec une étiquette N-terminal Profinity eXact™. Il utilise le promoteur fort T7lac inducible par l'IPTG et exprime constitutivement le répresseur lacI. Aussi, il confère la résistance à l'ampicilline. L'étiquette d'affinité de 8,2 kDa correspond à une forme du prodomaine de la protéase subtilisine BPN' de type sauvage. Sa conception a été réalisée de manière à ce qu'elle contienne en C-terminal la séquence de reconnaissance de clivage du mutant S189 de cette protéase (surlignée en jaune). Des fusions précises, c'est-à-dire chez lesquelles le produit purifié ne contient aucun acide aminé additionnel à son extrémité N-terminal, sont construites utilisant le site de restriction HindIII et un site de restriction approprié dans le site de clonage multiple (MCS). Par contre, les deux premiers résidus de certaines protéines nuisent à leur élution lors de la purification étant défavorables à la cinétique de clivage. Ce problème est résolu en ajoutant, lors du clonage, un espaceur de deux acides aminés (thréonine-sérine de préférence) entre l'étiquette et la protéine cible, ce qui résulte en une fusion imprécise. **B.** Étapes de la purification. La protéine de fusion interagit via l'étiquette d'affinité avec le mutant S189 de la protéase subtilisine immobilisé sur la matrice. Des lavages subséquents permettent d'éliminer les contaminants, c'est-à-dire les molécules qui interagissent de façon non-spécifique avec la résine. Ensuite, l'application d'un tampon contenant du fluorure de sodium déclenche le clivage subtilisine-dépendant de l'étiquette au niveau de l'extrémité C-terminal de la séquence de reconnaissance de clivage et l'étiquette demeure associée à la résine. Ainsi, la protéine cible est élue de façon native et ne conserve aucun résidu dérivé de l'étiquette Profinity eXact™ (*TAG-free*). Tiré et modifié de (manuel d'instruction du système de purification de protéines Profinity eXact™ de Bio-Rad).

A



B



2.1.3 Amplification de l'insert

L'amplification de l'ADN a été réalisée par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Les amorces utilisées, soit sens VP1HindIIIFor et anti-sens VP1M33EcoRIRev, permettent d'insérer les sites de restriction *HindIII* et *EcoRI*, respectivement. L'amorce sens a été conçue de manière à permettre la fusion précise de VP1M33 avec l'étiquette d'affinité et à préserver la séquence de reconnaissance de clivage (tableau I).

Tableau I. Amorces pour le clonage et le séquençage de VP1M33 dans le vecteur d'expression pPAL7.

Amorce	Séquence	Orientation	Site introduit	Tm (°C)
VP1HindIIIFor	CTTCAAAGCTTTG ATGGCACCACCGG	Sens	<i>HindIII</i>	62,4
VP1M33EcoRIRev	CGAGGAATTCTTA TGGCGCCGGACG	Anti-sens	<i>EcoRI</i>	63,5

La réaction a été effectuée en quadruplicata et les conditions étaient de : 10 μ L de tampon spécifique de la polymérase Fusion (5X), 0,5 μ L d'ADN polymérase thermostable Fusion (10X), 2 μ L d'amorce sens à 10 pmol/ μ L, 2 μ L d'amorce antisens à 10 pmol/ μ L, 1 μ L de dNTP à 10 mM, 5 μ L de matrice (vecteur pUC57 contenant VP1GS) à 1 ng/ μ L et 29,5 μ L d'eau PCR, le volume final étant de 50 μ L. Quant à lui, le programme était de: un cycle de 3 min à 95°C suivi de 30 cycles de 30 sec à 95°C, 30 sec à 62,4°C et 30 sec à 72°C et enfin, un dernier cycle de 10 min à 72°C. Une fois, la réaction terminée, 5 μ L du produit a été déposé sur gel d'agarose et migré afin d'évaluer si la réaction avait bien fonctionné. Les produits des quatre réactions ont été mélangés, précipités à l'éthanol puis resuspendus dans 32 μ L d'eau distillée.

2.1.4 Préparation de l'insert et du vecteur

La totalité de l'insert resuspendu a été digérée par les enzymes *HindIII* et *EcoRI*. Ainsi, 2 μL de chacune des enzymes Invitrogen (10 U/ μL) et 4 μL de tampon 2 Invitrogen (10X) ont été ajoutés, le volume final étant de 40 μL . La digestion a été effectuée pendant 3 hr à 37°C.

En ce qui concerne le vecteur, une midi-préparation d'ADN a été réalisée au préalable. Ensuite, 10 μL de vecteur à 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a été digéré par les mêmes enzymes, soit *HindIII* et *EcoRI*. Pour ce faire, 2 μL de celles-ci Invitrogen (10 U/ μL) et 4 μL de tampon 2 Invitrogen (10X) ont été ajoutés puis le volume a été ajusté à 40 μL avec de l'eau distillée déionisée. La réaction s'est déroulée durant 3 hr à 37°C. Enfin, le vecteur a été déphosphorylé par ajout de 2 μL de phosphatase Antarctic NEB (5 U/ μL), 5 μL du tampon de déphosphorylation NEB (10X) et 3 μL d'eau distillée, pour un volume final de 50 μL , suivi d'une incubation de 30 min à 37°C. L'enzyme a été inactivée via une incubation subséquente de 5 min à 65°C.

Chacun des produits de digestion a été par la suite déposé en totalité sur gel d'agarose et migré dans le but de procéder à une purification des bandes d'ADN.

2.1.5 Ligation et validation du clonage

La réaction a eu lieu en présence de 4 μL d'insert, 4 μL du vecteur, 1 μL de ligase d'ADN T4 NEB (400 U/ μL) et 1 μL de tampon de ligation NEB (10X). Le mélange a été incubé à température ambiante durant 1 hr puis 2 μL de celui-ci a été utilisé pour transformer des bactéries *E.coli* XL1-Blue.

Des mini-préparations d'ADN ont alors été réalisées et les clones ont été sélectionnés par digestion enzymatique. Deux clones positifs ont été séquencés

avec les deux amorces, soit sens et anti-sens, utilisées pour le clonage (tableau I). En dernier lieu, l'un d'entre eux a été officiellement choisi.

2.2 Expression de la protéine de fusion

Des bactéries *E.coli* BL21(DE3) ont été transformées avec 1 ng du clone pPAL7-VP1M33. Cette souche est déficiente au niveau des protéases lon et ompT et elle a intégré le gène de l'ARN polymérase T7, sous le contrôle du promoteur lacUV5, sur le chromosome via un lambda lysogène (DE3). Ensuite, 5 mL de milieu LB contenant 100 µg/mL d'ampicilline a été inoculé à l'aide d'une colonie transformée puis le tube a été incubé à 37°C toute la nuit sous agitation de 200 rpm. Cette culture a alors été utilisée pour inoculer 250 mL de milieu LB puis on a procédé à une incubation de 1h30 à 37°C, toujours sous agitation. Un volume de 1 mL de la culture a été récolté et le restant a été induit par ajout de 1,5 mM d'IPTG (2 235 µL d'une solution 40 mg/mL) et la culture a été incubée pour 3 hr supplémentaires à 34°C. Encore une fois, 1 mL de culture a été conservé pour l'évaluation approximative du taux d'expression. Le restant a été transféré dans un tube de plastique et a été centrifugé 5 min à 8000 x g à l'aide du rotor JA-14 dans une centrifugeuse Beckman. Le culot bactérien a été resuspendu dans 62,5 mL de phosphate de sodium 0,1 M pH 7,2.

2.3 Lyse cellulaire et solubilité de la protéine de fusion

La suspension bactérienne a été séparée en cinq aliquots de 12,5 mL dans des flacons de scintillation de 20 mL. Les cellules ont été lysées à l'aide d'ultrasons. Pour ce faire, les tubes ont été placés sur glace et pour chacun d'entre eux, on a procédé à six pulses de 20 sec séparés par des pauses d'environ 90 sec. Avant de poursuivre, on a analysé la solubilité de VP1M33 couplée à l'étiquette d'affinité. Ainsi, 50 µL du lysat a été récolté et cet échantillon correspond aux protéines totales. Aussi, 500 µL de lysat ont été centrifugés à 10 000 x g durant 5 min et 50 µL du surnageant a été conservé, il s'agit de l'échantillon de protéines solubles. Troisièmement, le culot résultant de la

dernière étape a été solubilisé dans un tampon 0,1 M phosphate de sodium pH 7,2 contenant 4 M urée puis la suspension a été centrifugée à 10 000 x g pendant 5 min. Nous avons alors récolté 50 µL et cet échantillon représente les protéines insolubles. Ensuite, 2 µL de tampon de chargement (5X) a été ajouté à 8 µL de chacun des trois échantillons et ceux-ci ont été mis à migrer sur gel de polyacrylamide afin d'analyser dans quelle fraction se trouvait la protéine d'intérêt. De plus, les deux échantillons récoltés dans la section précédente, soit avant et après induction, ont été centrifugés durant 5 min à 8000 x g. Les culots bactériens ont alors été resuspendus dans 80 µL de tampon 100 mM tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA puis 20 µL de tampon de chargement (5X) a été ajouté. Enfin, 20 µL et 10 µL des échantillons avant et après induction ont également été mis à migrer sur le gel à titre de témoins négatif et positif, respectivement. Une fois que la présence de la protéine cible dans la fraction soluble du lysat a été confirmée, la totalité de celui-ci a été centrifugée à 10 000 x g pendant 5 min et le surnageant, correspondant à la portion soluble, a été conservé.

2.4 Pré-purification de la protéine de fusion

Tout d'abord, la fraction soluble du lysat a été filtrée à l'aide d'une devise à seringue 0,45 µm. Par la suite, la protéine cible a été pré-purifiée par chromatographie échangeuse de cations via le système Sartobind[®] Microporous membrane adsorbers S15 de Sartorius, dont le groupe fonctionnel est l'acide sulfonique ($R-CH_2-SO_3^-$). En premier lieu, trois unités ont été couplées, soit une MA15 et deux MA75 puis celles-ci ont été équilibrées par filtration, à l'aide d'une seringue, de 40 mL de phosphate de sodium 0,1 M pH 7,2. Par la suite, l'échantillon a été filtré à deux reprises dans les unités, les deux éluats ont été conservés et mélangés. On a procédé ensuite au lavage par application de 60 mL du même tampon et encore une fois, l'éluat a été retenu. Afin d'éluer la protéine d'intérêt, 25 mL de phosphate de sodium 0,2 M pH 7,2 a été tout d'abord filtré au travers du montage puis 25 mL de phosphate de sodium 0,3 M pH 7,2 et

les deux éluats ont été mélangés. Les unités ont été régénérées par filtration de 60 mL de phosphate de sodium 0,1 M pH 7,2, 60 mL de NaOH 0,2 N puis de 30 mL du tampon phosphate à nouveau. Finalement, 2 μ L de tampon de chargement (5X) a été ajouté à 8 μ L de chacun des échantillons conservés afin d'analyser les différentes phases de la pré-purification.

2.5 Purification de VP1M33

Premièrement, l'échantillon pré-purifié devait être concentré puisque son volume était trop important pour assurer l'étape de purification suivante. Pour ce faire, on a utilisé le système Amicon[®] Centricon[®] Centrifugal Filter Devices YM-50 de Millipore. Ainsi, quatre devises ont été utilisées et 12,5 mL de produit d'élution de la pré-purification a été ajouté à chacune d'entre elles. Les filtres ont ensuite été centrifugés à 3000 x g durant 1h30 à 4°C. Le filtre a été inversé puis on a centrifugé à 2000 x g pour 7 min, toujours à 4°C, afin de récolter le concentré dans le réservoir du dessous, le filtrat était maintenant prêt à être purifié. La purification a eu lieu par chromatographie d'affinité utilisant le système Profinity eXact[™] protein purification de Bio-Rad. Ce dernier utilise une protéase (subtilisine BPN') immobilisée qui reconnaît et lie avidement l'étiquette d'affinité co-exprimée N-terminal (prodomaine de la protéase subtilisine BPN') dans la protéine de fusion. Suite aux lavages de la colonne, la protéase performe un clivage spécifique et enlève l'étiquette de la protéine de fusion directement sur la colonne, résultant en la relâche de la protéine recombinante avec une extrémité N-terminal native. En effet, durant l'élution, l'étiquette clivée en C-terminal de la séquence de reconnaissance de clivage demeure fortement associée à la colonne (figure 8b). 10 mini-colonnes contenant 100 μ L de résine ont été utilisées. Premièrement, chaque colonne a été placée dans un tube de collection de 2 mL. Le tampon d'entreposage (phosphate de sodium 0,1 M, sodium azide 0,02%, pH 7,2) a été enlevé par centrifugation de 30 sec à 1000 x g, le filtrat décanté et la colonne replacée dans le tube. Les colonnes ont été équilibrées par ajout de 500 μ L de phosphate de sodium 0,1 M pH 7,2 et on a centrifugé une

autre fois. Cette dernière opération a été répétée une deuxième fois puis on a procédé au dépôt du concentré sur colonne. Tout d'abord, le volume de celui-ci a été mesuré puis des fractions égales ont été ajoutées à chacune des colonnes. Après avoir délicatement mélangé la résine avec l'échantillon, les colonnes ont été incubées durant 2 hr à 4°C sur une plate-forme agitatrice. Par la suite, les colonnes ont été centrifugées et les éluats ont été conservés et combinés. Les colonnes ont alors été lavées par ajout de 500 µL de phosphate de sodium 0,1 M pH 7,2 suivi d'une centrifugation. Ce lavage a été répété une seule fois puis on a procédé à deux autres lavages mais cette fois-ci, avec du phosphate de sodium 1 M pH 7,2. Les éluats de chacun des lavages ont été réservés et les échantillons correspondant ont été mélangés ensemble. Ensuite, on a procédé à l'éluution par ajout de 500 µL d'un tampon fluorure de sodium 0,1 M, phosphate de sodium 0,1 M, pH 7,2 puis on a mélangé. Les éluats ont été récoltés par centrifugation suite à une incubation de 1 hr à température ambiante ou toute la nuit à 4°C puis ils ont été combinés ensemble. Les colonnes ont été régénérées par deux lavages avec de l'acide phosphorique (H_3PO_4) 0,1 M et rééquilibrées immédiatement grâce à deux lavages avec du phosphate de sodium 0,1 M pH 7,2. En dernier lieu, les échantillons récoltés durant les différentes étapes de la purification ont été analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Ainsi, 2 µL de tampon de chargement (5X) a été ajouté à 8 µL de ceux-ci puis le gel est chargé.

2.6 Conservation de VP1M33

Suite à la purification, VP1M33 se trouvait dans un volume final de 5 mL et dans le tampon fluorure de sodium 0,1 M, phosphate de sodium 0,1 M, pH 7,2. La protéine a été conservée à -20°C dans du glycérol 30%. Donc, 2,143 mL de glycérol 100% stérile a été ajouté à la solution protéique.

2.7 Dosage de VP1M33

La concentration de la protéine cible a été déterminée par la méthode de micro-essai de Bradford. Ainsi, des dilutions de l'échantillon, soit 1, 1:10 et 1:100, ont été préparées en duplicata dans un volume final de 100 μ L ajusté avec du tampon fluorure de sodium 0,1 M, phosphate de sodium 0,1 M, glycérol 30%, pH 7,2. Aussi, des volumes de 10, 20, 40, 60 et 80 μ L d'une solution standard de BSA (100 μ g/mL) ont été ajustés à 100 μ L avec de l'eau distillée de manière à obtenir des concentrations finales de protéines de 10, 20, 40, 60 et 80 μ g/mL, respectivement. Cette dernière opération a également été répétée en double et a été réalisée dans le but d'établir la courbe de calibration (standard). Par la suite, 1 mL du *dye reagent*, préalablement obtenu par dilution 1:5 du *Dye Reagent Concentrate* de Bio-Rad dans de l'eau distillée, a été ajouté à chacun des échantillons puis ceux-ci ont été bien mélangés. 1 mL de chaque réaction a alors été transféré dans des cuvettes à spectrophotomètre et nous avons procédé à la lecture de l'absorbance à 595 nm entre 2 min et 1 hr suivant l'ajout du réactif. Les blancs ont été obtenus en mélangeant 100 μ L du tampon dans lequel se trouvait l'échantillon de protéines d'intérêts ou le standard avec 1 mL du *dye reagent*. Finalement, la protéine a été concentrée à nouveau, mais cette fois, en utilisant le système Amicon[®] Microcon[®] Centrifugal Filter Devices YM-50 de Millipore. Ainsi, dix devises ont été utilisées et 0,5 mL d'échantillon a été ajouté à chacune d'entre elles. Les filtres ont ensuite été centrifugés à 14 000 x g à 4°C jusqu'à ce que la sécheresse des membranes soit atteinte, soit durant environ 30 min. Les membranes ont par la suite été rincées trois fois avec du tampon fluorure de sodium 0,1 M, phosphate de sodium 0,1 M, pH 7,2 puis 10 μ L de ce même tampon a été ajouté aux devises sèches. Les filtres ont alors été inversés puis on a centrifugé 3 min supplémentaires à 1000 x g afin de récolter les concentrés dans les réservoirs du dessous. Les filtrats ont été combinés de manière à obtenir un volume final d'à peu près 100 μ L.

2.8 Essais de résonance magnétique nucléaire

Les essais de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été réalisés par le Dr. Kalle Gehring à l'université McGill. Des spectres 1D de la protéine non-marquée ont été acquis en présence de 5 mM de Ca^{2+} .

3. Protocoles section régions basiques de VP1up

3.1 Clonage de VP1GS dans le vecteur intermédiaire pBluescript KS+

3.1.1 Description de l'insert et du vecteur

Comme mentionné précédemment, le fragment VP1GS correspond aux 525 premiers nucléotides en 5' du gène de VP1 et VP2. Il code une protéine de 175 acides aminés incluant toute la partie unique de VP1 (VP1up) en plus d'une petite séquence de 23 acides aminés commune à VP2. Les manipulations ont été effectuées à partir d'un gène codant la VP1GS dépourvue de son activité enzymatique sPLA₂, soit le gène de VP1GSHD⁻.

Pour l'introduction de mutations dans le gène de VP1GS, nous avons opté pour le plasmide pBluescript KS+ (pBLSK+) en tant que vecteur intermédiaire. Celui-ci a une taille de 2958 pb et il confère une résistance à l'ampicilline à la cellule hôte.

3.1.2 Amplification de l'insert

L'amplification de l'ADN a été réalisée par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Les amorces utilisées, soit sens FPVP1UPB et anti-sens RVPVP1UPE, permettent d'insérer les sites de restriction *Bam*HI et *Eco*RI, respectivement. Aussi, l'amorce anti-sens a été construite de manière à ne pas introduire de codon stop (tableau II).

Tableau II. Amorces pour le clonage de VP1GS(HD⁺) dans le vecteur intermédiaire pBluescript KS+.

Amorce	Séquence	Orientation	Site introduit	Tm (°C)
FPVP1VPB	CGAGGATCCGACATGGC GCTTCTTGCAAAGAGCA	Sens	<i>Bam</i> H1	68
RVPVP1UPE	TGCGAATTCGAGTTCA TTTCCTGTTGCAGAC	Anti-sens	<i>Eco</i> RI	65

La réaction a été effectuée en quadruplicata et les conditions étaient de : 10 µL de tampon spécifique de la polymérase Fusion (5X), 0,5 µL d'ADN polymérase thermostable Fusion (10X), 2 µL d'amorce sens à 10 pmol/µL, 2 µL d'amorce antisens à 10 pmol/µL, 1 µL de dNTP à 10 mM, 1 µL de matrice (vecteur pHD : une midi-préparation d'ADN a été réalisée au préalable) à 10 ng/µL et 33,5 µL d'eau PCR, le volume final étant de 50 µL. Quant à lui, le programme était de: un cycle de 3 min à 95°C suivi de 30 cycles de 30 sec à 95°C, 30 sec à 65°C et 40 sec à 72°C et enfin, un dernier cycle de 5 min à 72°C. Une fois, la réaction terminée, 5 µL du produit a été déposé sur gel d'agarose et migré afin d'évaluer si la réaction avait bien fonctionné. Les produits des quatre réactions ont été mélangés, précipités à l'éthanol puis resuspendus dans 32 µL d'eau distillée.

3.1.3 Préparation de l'insert et du vecteur

Voir la section 2.1.4. À l'exception que les enzymes utilisées sont *Bam*HI et *Eco*RI Invitrogen (10 U/µL) et que le tampon 3 Invitrogen (10X) a plutôt été utilisé.

3.1.4 Ligation et validation du clonage

Voir la section 2.1.5. À l'exception que les clones positifs ont été séquencés avec l'amorce FowpBluescriptKS+Seq (tableau III).

Tableau III. Amorce pour le séquençage de gènes clonés dans le MCS du vecteur intermédiaire pBluescript KS+.

Amorce	Séquence	Orientation
FowpBluescriptKS+Seq	GAATTGGAGCTCCACC	Sens

3.2 Clonage de mCherry dans le vecteur d'expression pcDNA3.1+

3.2.1 Description de l'insert et du vecteur

Le gène mCherry possède 711 nucléotides et il encode la protéine fluorescente mCherry dont le pic d'émission est à 610 nm. La masse moléculaire de celle-ci est de 26,72 kDa.

Pour l'expression des protéines de fusion, nous avons opté pour le vecteur d'expression pcDNA3.1+. Celui-ci a une taille de 5428 pb et utilise le promoteur précoce-immédiat du cytomégalovirus humain (CMV). Aussi, il confère une résistance à l'ampicilline à la cellule hôte.

3.2.2 Amplification de l'insert

L'amplification de l'ADN a été réalisée par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Les amorces utilisées, soit sens FowmCherryEcoRI et anti-sens RevmCherryXhoI, permettent d'insérer les sites de restriction *EcoRI* et *XhoI*, respectivement (tableau IV).

Tableau IV. Amorces pour le clonage de mCherry dans le vecteur d'expression pcDNA3.1+.

Amorce	Séquence	Orientation	Site introduit	Tm (°C)
FowmCherryEcoRI	CGTGAATTCATGG TGAGCAAGGGCG	Sens	<i>EcoRI</i>	63,4
RevmCherryXhoI	CRACTCGAGTTAC TTGTACAGCTCGT	Anti-sens	<i>XhoI</i>	62,6

La réaction a été effectuée en quadruplicata et les conditions étaient de : 10 µL de tampon spécifique de la polymérase Fusion (5X), 0,5 µL d'ADN polymérase thermostable Fusion (10X), 2 µL d'amorce sens à 10 pmol/µL, 2 µL d'amorce antisens à 10 pmol/µL, 1 µL de dNTP à 10 mM, 1 µL de matrice (vecteur pCG-Zeo-mCherry : une midi-préparation d'ADN a été réalisée au préalable) à 5 ng/µL et 33,5 µL d'eau PCR, le volume final étant de 50 µL. Quant à lui, le programme était de: un cycle de 3 min à 95°C suivi de 30 cycles de 30 sec à 95°C, 30 sec à 63°C et 50 sec à 72°C et enfin, un dernier cycle de 10 min à 72°C. Une fois, la réaction terminée, 5 µL du produit a été déposé sur gel d'agarose et migré afin d'évaluer si la réaction avait bien fonctionné. Les produits des quatre réactions ont été mélangés, précipités à l'éthanol puis resuspendus dans 32 µL d'eau distillée.

3.2.3 Préparation de l'insert et du vecteur

Voir la section 2.1.4. À l'exception que les enzymes utilisées sont *EcoRI* et *XhoI* Invitrogen (10 U/µL).

3.2.4 Ligation et validation du clonage

Voir la section 2.1.5. À l'exception que les clones positifs ont été séquencés avec l'amorce FowpcDNA3.1Seq (tableau V).

Tableau V. Amorce pour le séquençage de gènes clonés dans le MCS du vecteur d'expression pcDNA3.1+.

Amorce	Séquence	Orientation
FowpcDNA3.1Seq	CTAGCGTTTAAACTTAAGC	Sens

3.3 Inactivation des régions basiques de VP1up

De la mutagenèse dirigée a été effectuée dans les BRs de manière à remplacer des codons d'acides aminés polaires hydrophiles basiques par des codons d'acides aminés polaires hydrophiles neutres (réversion de la charge) afin d'inactiver les BRs ciblées. La BR3 a été étudiée plus en détails, elle a donc été séparée en 2 sections; R110-R111 et R114-K115 sont les acides aminés cibles de mutagenèse pour les mutants VP1GSBR3a et BR3b, respectivement. Des mutants simples et combinés, pour un total de 20 mutants, ont été générés à l'aide du protocole QuickChange de Stratagene. Chez les mutants simples, une seule BR est inactivée tandis que les mutants combinés possèdent plusieurs BRs inactivés. Ces derniers ont nécessité de nombreux cycles de mutagenèse séquentiels.

Mutants VP1GS (La nomenclature indique la(les) BR(s) inactivée(s) pour chaque mutant)

BR1	BR1/BR3b	BR4/BR5
BR3a	BR1/BR3	BR1/BR4
BR3b	BR3/BR4	BR1/BR5
BR3	BR3/BR5	BR1/BR4/BR5
BR4	BR3a/BR4/BR5	BR1/BR3/BR4/BR5
BR5	BR3b/BR4/BR5	BR1/BR2/BR3/BR4/BR5
BR1/BR3a	BR3/BR4/BR5	

Les mutations introduites sont indiquées en gras et en rouge dans la séquence des amorces sens utilisées pour la mutagenèse dirigée (tableau VI).

Tableau VI. Amorces pour la mutagenèse dirigée dans les régions basiques de VP1up.

Mutant	Mutation	Amorce	Séquence	Orientation
BR1	KR6/7NQ	2eVP1NLS1F	GCGCCTCTGCAAATC AAGCAAGAGGACTAA	Sens
		2eVP1NLS1R	TTAGTCCTCTTGCTTG ATTTGCAGGAGGCGC	Anti-sens
BR2	RKR86/88/ 89TNT	FowVP1BR5	CATTACTTCTTCA CAGCAAACA CTGCCTTTGCTCCAAA ACTCTC	Sens
		RevVP1BR5	GAGAGTTTTGGAGCAAAGGCAG TGTTTGCTGTGAAGAAGTAATG	Anti-sens
BR3a	RR110/111TQ	FowVP1NLS2- RR110/111TQ	CTCAACAACCAGAGGTAA CA GAATCGCCGAGAAAACACCC	Sens
		RevVP1NLS2- RR110/111TQ	GGGTGTTTTCTCGGCGATTC TGTTACCTCTGGTTGTTGAG	Anti-sens
BR3b	RK114/115TQ	FowVP1NLS2- RK114/115TQ	GGTAAGAAGATCGCCGAA CA ACCACCCAGGGTCTAAACC	Sens
		RevVP1NLS2- RK114/115TQ	GGTTTAGACCCTGGGTGGT TTGTCGGCGATCTTCTTACC	Anti-sens
BR4	KR124/125NT	FowVP1NLS3Part1- KR124/125NT	GGGTCTAAACCACCAGGAAAC ACACCTGCTCCAAGACATATTT	Sens
		RevVP1NLS3Part1- KR124/125NT	AAATATGTCTTGGAGCAGGTG TGTTTCCTGGTGGTTTAGACCC	Anti-sens
BR5	KKK137/138/ 139NTQ	2eVP1NLS3F	TTTATAAACTTAGCTAAC CCG CAGGCTAAAGGGACATCTAAT	Sens
		2eVP1NLS3R	ATTAGATGTCCCTTTAGCCTG CGTGTTAGCTAAGTTTATAAA	Anti-sens

Quatre mini-préparations d'ADN ont alors été réalisées pour la sélection des mutants par séquençage à l'aide de l'amorce FowpBluescriptKS+Seq (tableau III). En dernier lieu, un mutant positif a été officiellement choisi.

3.4 Transfert des mutants VP1GS dans le vecteur d'expression recombinant pcDNA3.1+-mCherry

3.4.1 Préparation de l'insert et du vecteur

Le transfert des mutants VP1GS dans le pcDNA3.1+-mCherry a été réalisé de manière à fusionner le gène cible à celui de la mCherry. En effet, les gènes mutants VP1GS ont été transférés via les sites *Bam*HI-*Eco*RI et le gène mCherry a été cloné selon les sites *Eco*RI-*Xho*I. Ainsi, mCherry fonctionne comme une étiquette C-terminal.

Les enzymes *Bam*HI et *Eco*RI ont été utilisées pour digérer 10 µL des deux vecteurs à 1 µg/µL. Ainsi, 2 µL de celles-ci Invitrogen (10 U/µL) et 4 µL de tampon 3 Invitrogen (10X) ont été ajoutés puis le volume a été ajusté à 40 µL avec de l'eau distillée déionisée. Les réactions se déroulaient durant 3 hr à 37°C. Enfin, le pcDNA3.1+-mCherry linéarisé a été déphosphorylé par ajout de 2 µL de phosphatase Antarctic NEB (5 U/µL), 5 µL du tampon de déphosphorylation NEB (10X) et 3 µL d'eau distillée, pour un volume final de 50 µL, suivi d'une incubation de 30 min à 37°C. L'enzyme a été inactivée via une incubation subséquente de 5 min à 65°C.

Chacun des produits de digestion a par la suite été déposé en totalité sur gel d'agarose et migré dans le but de procéder à une purification des bandes d'ADN.

3.4.2 Ligation et validation du clonage

Voir la section 2.1.5. À l'exception que les clones positifs ont été séquencés avec l'amorce FowpcDNA3.1Seq (tableau V).

3.5 Analyse de la distribution intracellulaire des mutants VP1GS

Les protéines de fusion mutantes et de type sauvage (témoin positif) ainsi que la mCherry seule (témoin négatif) ont été exprimées dans des cellules PT suite à la transfection de l'ADN correspondant grâce à la lipofectamine. Il est à noter que l'incubation principale se déroule à l'abri de la lumière.

Plasmides transfectés

pcDNA3.1+-VP1GSWT-mCherry

pcDNA3.1+-VP1GSBR(s)-mCherry (20)

pcDNA3.1+-mCherry

On a procédé, 24 hr post-transfection, à un immunomarquage indirecte de la lamine A grâce à l'anticorps primaire polyclonal de lapin dirigé spécifiquement contre cette protéine (dilution 1:1000) et à l'anticorps secondaire anti-lapin marqué à l'Alexa fluor 488 (dilution 1:2000).

La protéine nucléaire lamine A a été détectée par immunofluorescence indirecte tandis que les mutants VP1GS ont été détectés grâce à la fluorescence intrinsèque de mCherry et on a procédé à l'analyse de la distribution intracellulaire de ces derniers. Pour ce faire, les lamelles ont été observées à l'aide d'un microscope à épifluorescence Leitz Dialux 20 de Leica Microsystems au grossissement 40X et aux longueurs d'ondes d'émission de 450 nm (Hoechst) et de 600 nm (mCherry). Plus de 300 cellules transfectées résultantes d'au moins deux expériences indépendantes ont été analysées pour chaque protéine d'intérêt. Des images de cellules avec des phénotypes représentatifs ont été prises sous immersion à partir d'un microscope à épifluorescence Nikon Eclipse E800 de Nikon Instruments équipé d'un système d'imagerie confocale Bio-Rad Radiance 2000 de Bio-Rad au grossissement 60X (N.A. 1.4) et aux longueurs d'ondes d'émission de la mCherry et de 525 nm (Alexa fluor 488).

3.6 Analyse de la co-localisation de mutants VP1GS et de la protéine nucléolaire nucléoplasmine/B23

Ce volet de l'étude a été délégué à Maude Boisvert. Les protéines de fusion VP1GSWT (témoin positif), VP1GSBR1/BR2 et VP1GSBR1/BR3 ainsi que la mCherry seule (témoin négatif) ont été exprimées dans des cellules PT suite à la transfection de l'ADN correspondant. Il faut mentionner que l'incubation principale a été effectuée à l'abri de la lumière.

Plasmides transfectés

pcDNA3.1+-VP1GSWT-mCherry

pcDNA3.1+-VP1GSBR1/BR2 et BR1/BR3-mCherry (2)

pcDNA3.1+-mCherry

On a procédé, 24 hr post-transfection, à un immunomarquage indirecte de la B23 (nucléoplasmine) grâce à l'anticorps primaire monoclonal de souris dirigé spécifiquement contre cette protéine nucléolaire (dilution 1:500) et à l'anticorps secondaire anti-souris marqué à l'Alexa fluor 488 (dilution 1:2000).

Les mutants VP1GSBR1/BR2 et VP1GSBR1/BR3 ont été détectés grâce à la fluorescence intrinsèque de mCherry tandis que la protéine nucléolaire B23 a été détectée par immunofluorescence indirecte et on a procédé à l'analyse de la co-localisation des mutants et de la B23. Pour ce faire, les lamelles ont été observées sous immersion à l'aide d'un microscope à épifluorescence Nikon Eclipse TE2000-U de Nikon Instruments au grossissement 60X (N.A. 1.4) et aux longueurs d'ondes d'émission de 450 nm (Hoechst), de 525 nm (Alexa fluor 488) et de 600 nm (mCherry). Nous avons analysé 80 et 185 cellules transfectées avec un phénotype diffus pour les mutants et résultantes de deux expériences indépendantes pour les mutants BR1/BR3 et BR1/BR4, respectivement. Des images de cellules avec des phénotypes représentatifs ont été prises aux longueurs d'onde d'émission de l'Alexa fluor 488 et de la mCherry.

3.7 Transfert de mutants VP1GS dans le clone infectieux du PPV pNO NADL-2

3.7.1 Stratégie de clonage

Le transfert de mutations BRs intéressantes dans le clone infectieux du PPV pNO NADL-2 (pNO-N2) n'a pu être effectué directement étant donné l'absence de sites de restriction utilisables dans le génome et nécessitait donc plusieurs étapes de mutagenèse dirigée et de clonage. Entre autres, pour transférer les mutations cibles dans le clone infectieux, une extension a dû être ajoutée en 5' (ext5') du gène VP1GS. Cette extension correspond à un fragment de 617 nucléotides s'étendant du site *NheI* présent dans le gène des protéines NS jusqu'au site *PvuII* situé à l'intérieur du gène des protéines VP entre les BR1 et BR2 de VP1up. Aussi, une étape subséquente consistait à insérer une extension en 3' (ext3') du gène cible comportant 574 nucléotides et délimitée par le site *PsiI* situé dans le gène des protéines VP entre les BR4 et les BR5 de VP1up et le site *HindIII* présent dans la région du gène des protéines VP codant également la VP2. On retrouve deux sites *PvuII* et un site *PsiI* dans le vecteur intermédiaire pBluescript KS+ (pBLSK+) qui devaient préalablement être inactivés afin de permettre le clonage des extensions. Les expériences ont été débutées avec les mutations BR1 et BR1/BR4/BR5.

Mutants PPV (La nomenclature indique la(les) BR(s) de VP1up inactivée(s) pour chaque mutant)

BR1

BR1/BR4/BR5

Initialement, les sites *PvuII* et *PsiI* dans le pBLSK+ ont été inactivés par mutagenèse dirigée pour le mutant VP1GSBR1/BR4/BR5. Par la suite, l'extension 5' a été clonée ce qui résultait en la perte de la mutation BR1. Celle-ci a donc été à nouveau introduite par mutagenèse dirigée. À noter que ce clonage

entraînait également la réversion désirée de la mutation HD^r vers le phénotype sauvage. Le clonage de l'extension 3' devrait normalement entraîner la perte de la mutation BR5 mais pour pallier à ce problème, la mutation a été insérée dans l'amorce sens permettant d'amplifier cette extension. Suite à ce clonage, les mutations BR1 et BR1/BR4/BR5 pouvaient alors être transférées dans le clone infectieux via les sites *NheI-PvuII* et *NheI-HindIII*, respectivement.

3.7.2 Inactivation des sites *PvuII* et *PsiI*

Le pBLSK+ possède deux sites *PvuII*, soit aux positions 530 (#1) et 975 (#2), ainsi qu'un site *PsiI* à la position 100. Ces derniers ont été inactivés chez le mutant VP1GSBR1/BR4/BR5 par mutagenèse dirigée selon le protocole QuickChange de Stratagene. Leur inactivation nécessitait trois cycles de mutagenèse séquentiels.

Les mutations introduites sont indiquées en gras et en rouge dans la séquence des amorces sens utilisées pour la mutagenèse dirigée (tableau VII).

Tableau VII. Amorces pour la mutagenèse dirigée dans les sites *PvuII* et *PsiI* du vecteur intermédiaire pBluescript KS+.

Site	Position	Amorce	Séquence	Orientation
<i>PvuII</i> #1	530	Fow <i>PvuII</i> #1pBISKS+	CCTCTTCGCTATTACGCCAG G TGGCGAAAGGGGGATGTGC	Sens
		Rev <i>PvuII</i> #1pBISKS+	GCACATCCCCCTTTCGCCACC TGGCGTAATAGCGAAGAGG	Anti-sens
<i>PvuII</i> #2	975	Fow <i>PvuII</i> #2pBISKS+	GGGAAACCTGTCGTGCCAG G TGCATTAATGAATCGGCC	Sens
		Rev <i>PvuII</i> #2pBISKS+	GGCCGATTCATTAATGCAC CTGGCAGCAGGTTTCCC	Anti-sens
<i>PsiI</i>	100	Fow <i>PsiI</i> pBISKS+	CCGAAATCGGCAAAATCCCTTAG G AAATCAAAGAATAGACCGAGA	Sens
		Rev <i>PsiI</i> pBISKS+	TCTCGGTCTATTCTTTGATTTC TAAGGGATTTTGCCGATTTCGG	Anti-sens

La sélection des mutants a été réalisée par digestion enzymatique. Pour chaque réaction, quatre mini-préparations d'ADN ont d'abord été effectuées selon le protocole réalisé dans l'optique de séquencer les échantillons. Ensuite, 5 μ L de chacune d'entre elles ainsi que 5 μ L de l'ADN de départ (matrice) ont été digérés par l'enzyme de restriction dont le site était ciblé par la mutagenèse dirigée, soit *PvuII* ou *PsiI*. Les conditions des réactions étaient de : 0,5 μ L de *PvuII* Invitrogen (10 U/ μ L) ou 1 μ L de *PsiI* NEB (5 U/ μ L), 1 μ L de tampon 6 Invitrogen (10X) dans le cas d'une digestion par *PvuII* ou 4 NEB (10X) en ce qui concernait plutôt une digestion par *PsiI* et le volume était ajusté à 10 μ L avec de l'eau distillée. Les réactions se déroulaient pendant 1h30 à 37°C puis les produits ont été migrés en totalité sur gel d'agarose. Les mutants positifs ont alors été sélectionnés grâce à l'analyse du profil des bandes. Enfin, l'un d'entre eux a été officiellement choisi et le restant de sa mini-préparation d'ADN a été utilisé pour un cycle subséquent de mutagenèse dirigée. Suite au dernier cycle, la mini-culture du triple mutant positif (trois sites inactivés) choisi a été striée via un manche de Koch sur une gélose LB-agar puis cette dernière a été incubée à 37°C durant 16 hr. Une midi-préparation d'ADN a alors été réalisée afin

d'effectuer le clonage subséquent et pour conserver l'ADN à -20°C. Aussi, 500 µL de la culture utilisée pour l'extraction d'ADN a été combiné à 500 µL de glycérol 50% stérile pour conservation à -80°C.

3.7.3 Clonage de l'extension 5'

3.7.3.1 Amplification de l'insert

L'amplification de l'ADN a été réalisée par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Les amorces utilisées, soit sens FowNS(ext5')NheI/SpeI et anti-sens RevVP(ext5')PvuII, permettent d'insérer les sites de restriction *NheI/SpeI* et *PvuII*, respectivement. L'amorce sens a été conçue afin d'introduire le site *SpeI* en plus du site *NheI* puisque ce dernier est absent dans le pBLSK+ (tableau VIII).

Tableau VIII. Amorces pour le clonage de l'extension 5' dans le vecteur intermédiaire pBluescriptKS+ *PvuII*/*PsiI* contenant VP1GSBR1/BR4/BR5.

Amorce	Séquence	Orientation	Site introduit	Tm (°C)
FowNS(ext5') NheI/SpeI	CGTAAACTAGTGCTAGC TATATGCATCATTGGGG	Sens	<i>NheI/SpeI</i>	61,1
RevVP(ext5')PvuII	CTTCATCAGCTGCTGAGAA GTAGAAGTATGGATTTTTTCC	Anti-sens	<i>PvuII</i>	62

La réaction a été effectuée en quadruplicata et les conditions étaient de : 10 µL de tampon spécifique de la polymérase Fusion (5X), 0,5 µL d'ADN polymérase thermostable Fusion (10X), 2 µL d'amorce sens à 10 pmol/µL, 2 µL d'amorce antisens à 10 pmol/µL, 1 µL de dNTP à 10 mM, 1 µL de matrice (clone infectieux pNO-N2 : une midi-préparation d'ADN a été réalisée au préalable) à 1 ng/µL et 33,5 µL d'eau PCR, le volume final étant de 50 µL. Quant à lui, le programme était de: un cycle de 3 min à 95°C suivi de 30 cycles de 30 sec à 95°C, 30 sec à 62°C et 40 sec à 72°C et enfin, un dernier cycle de 5 min à 72°C. Une fois, la réaction terminée, 5 µL du produit a été déposé sur gel d'agarose et

migré afin d'évaluer si la réaction avait bien fonctionné. Les produits des quatre réactions ont été mélangés, précipités à l'éthanol puis resuspendus dans 28 μL d'eau distillée.

3.7.3.2 Préparation de l'insert et du vecteur

Voir la section 2.1.4. À l'exception que les enzymes utilisées sont *SpeI* et *PvuII* NEB (10 U/ μL) et que le tampon 2 NEB (10X) a plutôt été utilisé. De plus, 4 μL d'une solution de BSA (10X) a également été ajouté aux réactions. Aussi, à noter que la midi-préparation d'ADN du vecteur avait déjà été effectuée.

3.7.3.3 Ligation et validation du clonage

Voir la section 2.1.5. À l'exception que les clones positifs ont été séquencés avec l'amorce FowpBluescriptKS+Seq (tableau III).

3.7.4 Réinsertion de la mutation BR1

Comme mentionné précédemment, le clonage de l'extension 5' entraînait la réversion de la mutation puisqu'elle se trouve en amont du site *PvuII*. Celle-ci a donc été à nouveau introduite.

Voir la section 3.3.

3.7.5 Clonage de l'extension 3'

3.7.5.1 Amplification de l'insert

L'amplification de l'ADN a été réalisée par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Les amorces utilisées, soit sens FowVPBR5(ext3')*Psil* et anti-sens RevVP(ext3')*HindIII* permettent d'insérer les sites de restriction *Psil* et *HindIII*,

respectivement. De plus, l'amorce sens a été conçue de manière à contenir la mutation BR5 puisque qu'autrement, ce clonage résulterait au retour vers le phénotype sauvage étant donné qu'elle est située en aval du site *PsiI*. Les mutations introduites via l'amorce sens sont indiquées en gras et en rouge dans sa séquence (tableau IX).

Tableau IX. Amorces pour le clonage de l'extension 3' dans le vecteur intermédiaire pBluescriptKS+ *PvuII*/*PsiI* contenant (ext5')VP1GSBR1/BR4/BR5.

Amorce	Séquence	Orientation	Site introduit	Tm (°C)
FowVPBR5(ext3') <i>PsiI</i>	GTTTTATAAACTTAGCTAAC CACGC AGGCTAAAGGGACATCTAATAC	Sens	<i>PsiI</i>	62,4
RevVP(ext3') <i>HindIII</i>	GGGAAGCTTGCAGTTAGATCA TTATTATATATTTGGTTGGTGG	Anti-sens	<i>HindIII</i>	62

La réaction a été effectuée en quadruplicata et les conditions étaient de : 10 µL de tampon spécifique de la polymérase Fusion (5X), 0,5 µL d'ADN polymérase thermostable Fusion (10X), 2 µL d'amorce sens à 10 pmol/µL, 2 µL d'amorce antisens à 10 pmol/µL, 1 µL de dNTP à 10 mM, 1 µL de matrice (clone infectieux pNO-N2) à 1 ng/µL et 33,5 µL d'eau PCR, le volume final étant de 50 µL. Quant à lui, le programme était de: un cycle de 3 min à 95°C suivi de 30 cycles de 30 sec à 95°C, 30 sec à 62,8°C et 40 sec à 72°C et enfin, un dernier cycle de 5 min à 72°C. Une fois, la réaction terminée, 5 µL du produit a été déposé sur gel d'agarose et migré afin d'évaluer si la réaction avait bien fonctionné. Les produits des quatre réactions ont été mélangés, précipités à l'éthanol puis resuspendus dans 24 µL d'eau distillée.

3.7.5.2 Préparation de l'insert et du vecteur

La totalité de l'insert resuspendu a été digérée par les enzymes *PsiI* et *HindIII*. La digestion se déroulait en deux parties puisque les tampons des enzymes impliquées ne sont pas compatibles. Tout d'abord, 3 µL de *PsiI* NEB (5 U/µL) et 3

μL de tampon 2 NEB (10X) ont été ajoutés, pour un volume total de 30 μL et le mélange a été incubé à 37°C durant 1h30. En deuxième lieu, 4 μL de Tris-HCl 400 mM pH 8, 1 μL de tampon 2 NEB (10X), 3,5 μL d'eau distillée et 1,5 μL de *HindIII* Invitrogen (10 U/ μL) ont été ajoutés pour un volume final de 40 μL . Enfin, on a procédé à une seconde incubation de 1h30 à 37°C.

Ces mêmes enzymes, soit *PsiI* et *HindIII*, ont été utilisées pour digérer 10 μL de vecteur à 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ et encore une fois, la digestion a été effectuée en deux temps. Ainsi, 3 μL de *PsiI* NEB (5 U/ μL) et 3 μL de tampon 2 NEB (10X) ont été ajoutés puis le volume a été ajusté à 30 μL avec de l'eau distillée déionisée. La réaction se déroulait durant 1h30 à 37°C. Ensuite, 4 μL de Tris-HCl 400 mM pH 8, 1 μL de tampon 2 NEB (10X), 3 μL d'eau distillée et 2 μL de *HindIII* Invitrogen (10 U/ μL) ont été ajoutés de manière à obtenir un volume final de 40 μL et le mélange a été à nouveau incubé pour 1h30 à 37°C. Finalement, le vecteur a été déphosphorylé par ajout de 2 μL de phosphatase Antarctic NEB (5 U/ μL), 5 μL du tampon de déphosphorylation NEB (10X) et 3 μL d'eau distillée, pour un volume final de 50 μL , suivi d'une incubation de 30 min à 37°C. L'enzyme a été inactivée via une incubation subséquente de 5 min à 65°C.

Chacun des produits de digestion a été par la suite déposé en totalité sur gel d'agarose et migré dans le but de procéder à une purification des bandes d'ADN.

3.7.5.3 Ligation et validation du clonage

Voir la section 2.1.5. À l'exception que les clones positifs ont été séquencés avec l'amorce 2525F (tableau X).

Tableau X. Amorce pour le séquençage de la région en aval de la position 2525 du génome viral.

Amorce	Séquence	Orientation
2525F	TACTTCTACTTCTCAGCAGC	Sens

3.7.6 Clonage du fragment contenant la mutation BR1

3.7.6.1 Préparation de l'insert et du vecteur

La mutation BR1 a été transférée dans le clone infectieux du PPV via le clonage de la région délimitée par le site *NheI*, situé dans le gène des protéines NS, et le site *PvuII* se trouvant dans le gène des protéines VP, entre les mutations BR1 et BR2.

Les enzymes *NheI* et *PvuII* ont été utilisées pour digérer 10 µL des deux vecteurs à 1 µg/µL. Ainsi, 2 µL de celles-ci NEB (10 U/µL), 4 µL de tampon 2 NEB (10X) et 4 µL d'une solution de BSA (10X) ont été ajoutés puis le volume a été ajusté à 40 µL avec de l'eau distillée déionisée. Les réactions se déroulaient durant 3 hr à 37°C. Enfin, le pNO-N2 linéarisé a été déphosphorylé par ajout de 2 µL de phosphatase Antarctic NEB (5 U/µL), 5 µL du tampon de déphosphorylation NEB (10X) et 3 µL d'eau distillée, pour un volume final de 50 µL, suivi d'une incubation de 30 min à 37°C. L'enzyme a été inactivée via une incubation subséquente de 5 min à 65°C.

Chacun des produits de digestion a par la suite été déposé en totalité sur gel d'agarose et migré dans le but de procéder à une purification des bandes d'ADN.

3.7.6.2 Ligation et validation du clonage

Voir la section 2.1.5 concernant la réaction de ligation. À l'exception que des bactéries *E.coli* Sure ont plutôt été utilisées afin d'éviter les recombinaisons d'ADN.

Quatre mini-préparations d'ADN ont alors été réalisées pour la sélection des clones par séquençage à l'aide de l'amorce 1770F (tableau XI). En dernier lieu, un clone positif a officiellement été choisi.

Tableau XI. Amorce pour le séquençage de la région en aval de la position 1770 du génome viral.

Amorce	Séquence	Orientation
1770F	AGGATGCGAGGAAAGAC	Sens

3.7.7 Clonage du fragment contenant les mutations BR1/BR4/BR5

3.7.7.1 Préparation de l'insert et du vecteur

Les mutations BR1/BR4/BR5 ont été transférées dans le clone infectieux du PPV via le clonage de la région délimitée par le site *NheI*, situé dans le gène des protéines NS, et le site *HindIII* se trouvant dans le gène des protéines VP, en aval de la mutation BR5.

Les enzymes *NheI* et *HindIII* ont été utilisées en deux temps pour digérer 10 µL des deux vecteurs à 1 µg/µL. Ainsi, 3 µL de *NheI* NEB (5 U/µL), 3 µL d'une solution de BSA (10X) et 3 µL de tampon 2 NEB (10X) ont été ajoutés puis le volume a été ajusté à 30 µL avec de l'eau distillée déionisée. La réaction se déroulait durant 1h30 à 37°C. Ensuite, 4 µL de Tris-HCl 400 mM pH 8, 1 µL de tampon 2 NEB (10X), 3 µL d'eau distillée et 2 µL de *HindIII* Invitrogen (10 U/µL) ont été ajoutés de manière à obtenir un volume final de 40 µL et le mélange a été

à nouveau incubé pour 1h30 à 37°C. Finalement, le pNO-N2 linéarisé a été déphosphorylé par ajout de 2 µL de phosphatase Antarctic NEB (5 U/µL), 5 µL du tampon de déphosphorylation NEB (10X) et 3 µL d'eau distillée, pour un volume final de 50 µL, suivi d'une incubation de 30 min à 37°C. L'enzyme a été inactivée via une incubation subséquente de 5 min à 65°C.

Chacun des produits de digestion a par la suite été déposé en totalité sur gel d'agarose et migré dans le but de procéder à une purification des bandes d'ADN.

3.7.7.2 Ligation et validation du clonage

Voir la section 3.7.6.2. À l'exception que les clones ont également été séquencés à l'aide de l'amorce 2525F (tableau X).

3.8 Analyse de l'infectivité des mutants du PPV

Ces travaux ont été effectués en collaboration avec Maude Boisvert. Les clones infectieux du PPV mutants et de type sauvage (témoin positif) ont été transfectés dans des cellules PT grâce à la lipofectamine.

Plasmides transfectés

pNO-N2WT

pNO-N2BR1 et BR1/BR4/BR5 (2)

Parallèlement, les cellules PT ont étéensemencées dans une plaque à 6 puits. Plus précisément, 2 mL de suspension cellulaire à 1×10^5 cellules/mL a été ajouté à chacun des puits (2×10^5 cellules/puit) et les cellules ont été cultivées à 37°C en présence de 5% de CO₂ durant environ 16 hr ou jusqu'à ce que la confluence atteigne à peu près 50%. Le surnageant des transfections a été ajouté aux cellules de la plaque à 6 puits, 48 hr post-transfection, puis cette dernière a été à nouveau incubée sous les mêmes conditions.

Le surnageant a été récolté, 6 jours post-transfert, afin de procéder à un titrage. Pour ce faire, une plaque à 96 puits a été préalablementensemencée de cellules par ajout de 100 µL/puit de suspension cellulaire de même concentration que ci-haut. En effet, la confluence devait aussi être d'environ 50% lors de l'infection 16 hr post-incubation sous les conditions normales de croissance. Des dilutions en série (10^{-1} à 10^{-4}) des différents échantillons ont été préparées dans du milieu DMEM Gibco® BRL pour un volume total de 300 µL. Le milieu a été retiré des puits de la plaque à 96 puits et ensuite, 100 µL de chacune des dilutions (3 puits/dilution) a été utilisé pour infecter les cellules. Aussi, des cellules non-infectées ont été utilisées à titre de témoin négatif. La plaque a alors été soumise aux mêmes conditions d'incubation et 20 hr post-infection, on a réalisé un immunomarquage indirecte de la capsid grâce à l'anticorps primaire monoclonal 3C9-D11-H11 anti-capsid de souris (dilution 1:50) et à l'anticorps secondaire anti-souris marqué à l'Alexa fluor 568 (dilution 1:2000).

Les virions ont été détectés par immunofluorescence indirecte et on a déterminé les titres viraux. Pour ce faire, les cellules ont été observées à l'aide d'un microscope à épifluorescence Leitz Dialux 20 de Leica Microsystems aux longueurs d'ondes d'émission de 450 nm (Hoechst) et de 600 nm (Alexa fluor 568). Pour chaque échantillon, on a compté le nombre de noyaux positifs dans les puits correspondant à la dilution où il y a entre 20 et 200 foyers positifs. Les titres ont été déterminés par le nombre de foyers fluorescents par mL (FFU = fluorescent foci unit/mL).

$$\text{Titrage} = \frac{\text{\# de noyaux positifs}}{\text{Volume de virus (mL) x dilution}}$$

Les résultats dérivent de deux expériences indépendantes.

3.9 Analyse de la production virale pour les mutants du PPV

3.9.1 Immunoprécipitation des capsides

Ces travaux ont été effectués en collaboration avec Maude Boisvert. Les clones mutants ainsi que le clone de type sauvage (témoin positif) ont été transfectés dans des cellules PT via la lipofectamine. Le milieu de culture (500 µL) a été retiré des puits 48 hr post-transfection, les cellules ont été lavées avec du PBS 1X puis on a ajouté 500 µL de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, complete protease inhibitor cocktail 1x (Roche Applied Science)). Les cellules ont été récoltées en grattant les puits et transférées dans des tubes puis ceux-ci ont été incubés pendant 2 hr sur glace. Le lysat a été pré-purifié avec 20 µL de billes protéine G-agarose pour 30 min sur glace avec une légère agitation puis centrifugé durant 30 sec à 10 000 x g. Le surnageant a alors été incubé avec 100 µL d'anticorps spécifique anti-capside (3C9-D11-H11) pour 1 hr sur glace avec une agitation délicate. Un volume de 50 µL des billes (protéine G-agarose) a ensuite été ajouté et on a procédé à une autre incubation d'au moins 2 hr. Les billes ont été récoltées grâce à une rapide et courte centrifugation et lavées trois fois avec le tampon de lyse, deux fois avec le tampon de lavage 1 (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 0.1% NP-40) et finalement, une fois avec le tampon de lavage 2 (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0.1% NP-40). Pour chaque lavage, 500 µL de tampon a été ajouté et on a incubé 5 min sur glace avec agitation avant de procéder à une rapide et courte centrifugation. Les protéines ont été éluées avec du tampon d'échantillon SDS-PAGE 2X (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS [p/v], 0.2% bromophenol blue [p/v], 5% β-mercaptoethanol [v/v]) dans de l'eau bouillante pour 5 min.

3.9.2 PCR quantitatif des génomes viraux encapsidés

Ces travaux ont été effectués en collaboration avec Maude Boisvert. Chaque échantillon a été dilué 1:100 dans le but d'effectuer le PCR et on a réalisé le PCR

quantitatif (qPCR) selon la réaction SYBR[®] Green (Wilhelm *et al.*, 2006). Les amorces utilisées, soit sens qPCRPPVFor et anti-sens qPCRPPVRev, sont spécifiques à la région VP2 (tableau XII).

Tableau XII. Amorces pour déterminer le nombre de copies de génome du PPV par PCR quantitatif.

Amorce	Séquence	Orientation
qPCRPPVFor	GGGGGAGGGCTTGGTTAGAATCAC	Sens
qPCRPPVRev	ACCACACTCCCCATGCGTTAGC	Anti-sens

Le programme était de: un cycle de 10 min à 95°C suivi de 40 cycles de 15 sec à 95°C et 60 sec à 60°C. La fluorescence a été acquise après chaque cycle. Les amplifications ont été effectuées dans un système RotorGene 3000 (Corbett) avec 2X de Sybr green master mix (ABSciences). Les courbes standard ont été réalisées en utilisant un plasmide contenant le PPV tandis que les courbes du PPV ont été obtenues à partir du clone infectieux dans le vecteur pSmarHC AmpR. L'analyse de la courbe de fusion a été réalisée de 60°C à 95°C, avec une augmentation de 1°C à chaque étape de 30 sec, pour un témoin d'amplification de produit spécifique.

RÉSULTATS

1. Activité phospholipase A₂ sécrétée de VP1up

1.1 Structure tridimensionnelle du domaine phospholipase A₂ de VP1up

Nous souhaitons élucider la structure de la région flexible de VP1, c'est-à-dire sa région N-terminal. Nous avons donc procédé à une étude structurale de celle-ci par résonance magnétique nucléaire (RMN). Cette technique s'imposait puisque malgré de nombreuses tentatives, notre laboratoire a été incapable de visualiser cette région par cristallographie. Nous avons décidé d'exprimer puis de soumettre à la RMN le fragment VP1M33. Celui-ci code la région N-terminal de VP1up comprenant le domaine PLA₂. Bien que ce polypeptide n'inclut pas toute la région flexible de VP1 qui n'est pas visible en cristallographie, nous avons préféré débiter les études structurales avec ce fragment afin d'obtenir une meilleure résolution de la structure du motif enzymatique.

Les premières étapes dans l'obtention de la structure protéique sont l'expression et la purification du polypeptide d'intérêt. En premier lieu, la séquence du gène VP1GS, incluant le fragment VP1M33, a été optimisée afin de favoriser l'expression du fragment VP1M33 en bactéries *E.coli*. Par la suite, le gène optimisé de VP1M33 a été cloné dans le vecteur d'expression pPAL7, utilisant le promoteur T7lac, de manière à le fusionner à celui du gène de l'étiquette d'affinité Profinity eXact™. L'expression a eu lieu en bactéries *E.coli* BL21 (DE3) durant 3 hr à 34° et suite à l'induction avec 1,5 mM d'IPTG. Cette souche bactérienne a été utilisée puisqu'elle facilite l'isolation de la protéine recombinante intacte, étant déficiente au niveau de protéases, et parce que son génome comprend le gène de l'ARN polymérase T7. Des échantillons de la culture cellulaire ont été récoltés avant et après induction. Ensuite, les cellules ont été lysées par sonication et parallèlement la solubilité de la protéine recombinante a été analysée. Plus précisément, nous souhaitons déterminer dans quelle fraction du lysat cellulaire, soit soluble ou insoluble, se retrouvait la

protéine cible. Pour ce faire, les protéines du surnageant et les protéines du culot solubilisées grâce à un traitement avec de l'urée ont été analysées séparément par SDS-PAGE. Aussi, le lysat total, comprenant les deux fractions, a été analysé en tant que témoin positif. De plus, les échantillons avant et après induction ont également été analysés en tant que témoin négatif et second témoin positif, respectivement (pas montré). Les résultats obtenus démontrent que la protéine d'intérêt se retrouve majoritairement dans la fraction soluble du lysat cellulaire (figure 9). Ainsi, cette fraction du lysat a été pré-purifiée par chromatographie échangeuse de cations. En effet, la protéine recombinante est acide (chargée positivement) au pH du tampon de lyse cellulaire (pH 7,2), son point isoélectrique étant supérieur à celui-ci (environ pH 9,7). La purification a eu lieu par chromatographie d'affinité utilisant le système Profinity eXact™ de Bio-Rad. La pré-étape de purification permet d'éliminer un bon nombre de contaminants et par conséquent, d'augmenter l'affinité pour la colonne et l'efficacité de l'élution en diminuant la compétition. Quant-à-elle, l'étape principale de purification génère la protéine d'intérêt de forme native puisque l'étiquette de fusion N-terminal Profinity eXact™ demeure associée à la colonne lors de l'élution, ce qui représente un avantage majeur pour les études structurales. La protéine purifiée a été dosée par la méthode de micro-essai de Bradford afin de déterminer le rendement de production. Ainsi, nous avons obtenu un rendement de production de 4 mg de VP1M33 purifiée par litre de culture. De plus, elle a été analysée par SDS-PAGE, ce qui a permis d'estimer le taux de pureté à 99%. Uniquement deux bandes sont visibles sur le gel, l'une correspondant à VP1M33 native et une seconde d'intensité beaucoup moins importante qui représente la protéine de fusion. Ainsi, une faible proportion des protéines d'intérêts demeure associée à l'étiquette suite à la purification (figure 10). Plusieurs spectres RMN 1D de la protéine non-marquée ont été acquis à l'université McGill en collaboration avec le Dr. Kalle Gehring. Malheureusement, cette première étape vers la résolution de la structure nous a indiqué qu'il était impossible de progresser avec ce construit. En effet, nous avons rencontré des problèmes majeurs et bien que nous ayons testé différentes conditions, ceux-ci n'ont pu être

résolus. Tout d'abord, le premier problème important que nous avons rencontré est l'incapacité à reproduire les spectres. Nous observions une grande variabilité dans les signaux provenant de différents spectres acquis du même échantillon et ce, sous les mêmes conditions. Le deuxième problème majeur auquel nous avons fait face est l'aspect des signaux, ceux-ci étant faibles et larges en général. Ainsi, nous n'avons pu poursuivre les expériences et avons donc été dans l'incapacité d'obtenir la structure 3D de ce domaine enzymatique.

Figure 9. Analyse SDS-PAGE de la solubilité de la protéine de fusion. Le vecteur d'expression recombinant a été transformé en bactéries *E.coli* BL21 (DE3). Les cellules ont été cultivées à 37°C jusqu'à obtention d'une A_{600} de 0.5. Les conditions d'expression étaient de 3 hr à 34°C en présence de 1,5 mM d'IPTG. Le gel 12% a été coloré au Coomassie. PM: marqueur de poids moléculaire (kDa), T: protéines totales, S: protéines solubles, IS: protéines insolubles. La flèche indique la position de VP1M33 «tagged» (protéine de fusion).

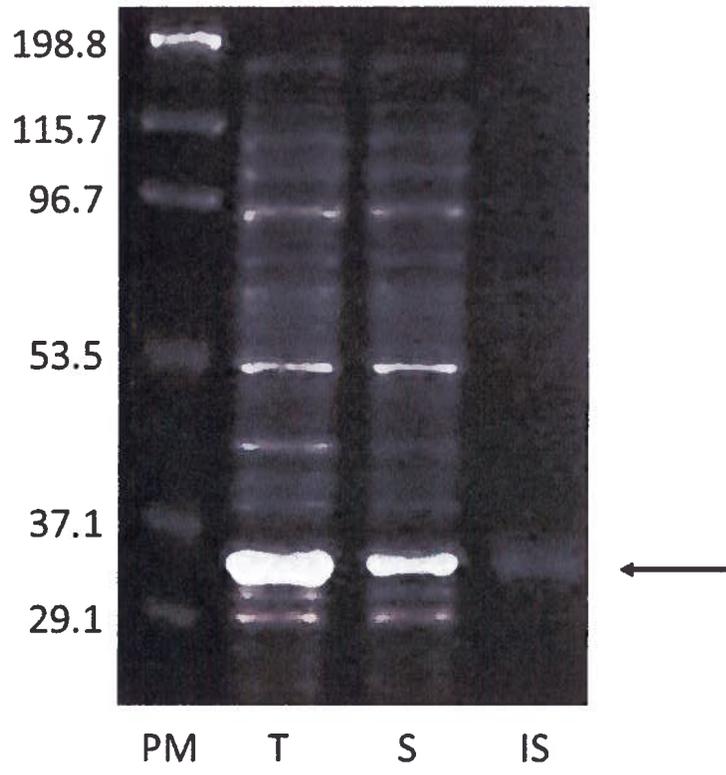
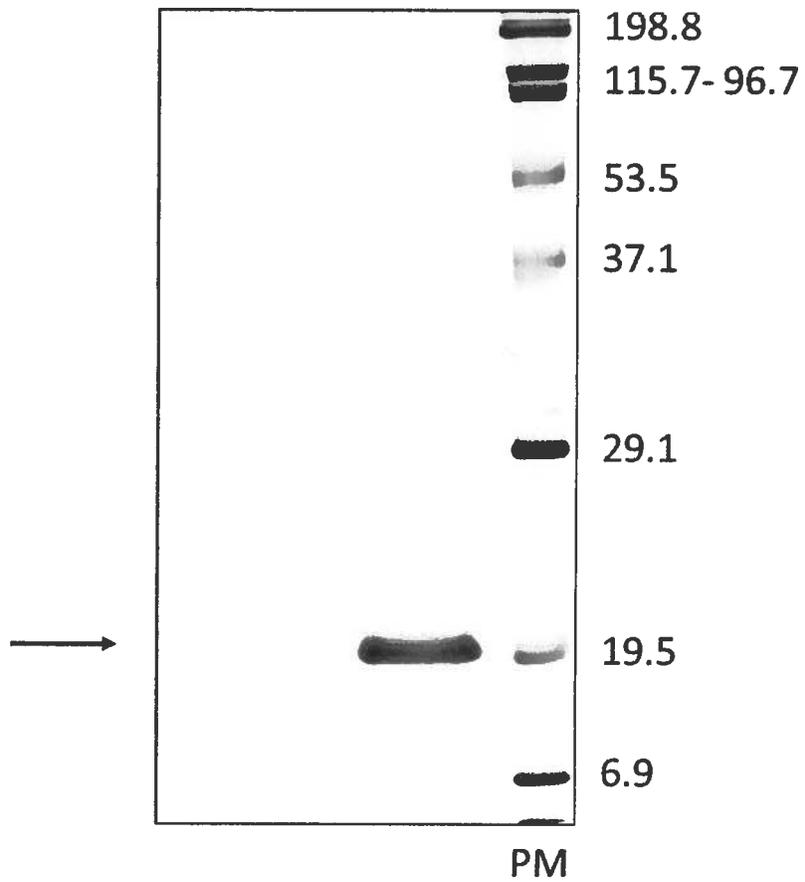


Figure 10. Analyse SDS-PAGE de VP1M33 purifiée. La protéine de fusion exprimée a été purifiée sous conditions natives par chromatographie échangeuse de cations utilisant une unité Sartobind avec une membrane de type-S (Sartorius) puis par chromatographie d'affinité utilisant une résine Profinity eXact (Bio-Rad). Le gel 12% a été coloré au Coomassie. PM: marqueur de poids moléculaire (kDa). La flèche indique la position de VP1M33 «TAG-free» (extrémité N-terminal native).



2. Régions basiques de VP1up

2.1 Activité de transport nucléaire des régions basiques de VP1up

Afin de déterminer si les BRs de VP1up correspondent à des NLSs, leur activité de transport nucléaire a été évaluée. Pour ce faire, nous devons réduire l'influence des motifs de localisation nucléaire (NLM) présent dans la région commune à VP2. Ainsi, les manipulations ont été effectuées avec le gène codant uniquement la partie N-terminal de VP1, c'est-à-dire le fragment VP1GS codant pour VP1up en plus d'une petite région en N-terminal de VP2, se terminant juste avant le domaine riche en glycines impliqué dans l'externalisation de VP1up. Aussi, afin d'éviter la toxicité due à la pvPLA₂, nous avons travaillé à partir du mutant HD⁻ de VP1GS codant la protéine chez laquelle l'activité enzymatique est inhibée. C'est-à-dire, un mutant pour lequel les acides aminés du site catalytique de la pvPLA₂, soit l'histidine (H) et l'acide aspartique (D), ont été mutés en alanine (A) et en asparagine (N) respectivement, abolissant ainsi l'activité enzymatique (0,005% d'activité relative).

VP1GS a d'abord été clonée dans un vecteur intermédiaire puis de la mutagenèse dirigée a été réalisée dans les BRs afin de les inactiver. Pour ce faire, des acides aminés polaires hydrophiles basiques de BRs cibles ont été mutés en résidus polaires hydrophiles neutres. Une attention particulière a été portée à la BR3 puisque, contrairement aux autres BRs, elle n'est pas conservée entre le MVM et le PPV. Ainsi, les duos d'acides aminés R110-R111 et R114-K115, correspondant respectivement aux sections a et b de la BR3, ont été étudiés séparément. Au contraire, la BR2 a été étudiée de façon moins importante puisqu'elle possède une forte homologie de séquence avec le BC2 du MVM et que celui-ci se comporte comme un NLS faible chez ce virus. Les résidus cibles pour la mutagenèse sont indiqués en rouge pour chaque BR dans le schéma de la figure 11a. Au total, 20 mutants ont été générés et forment deux groupes, les mutants simples chez lesquels une seule BR est inactivée et les

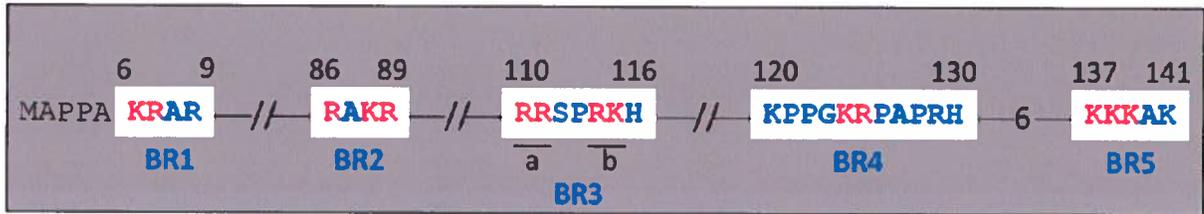
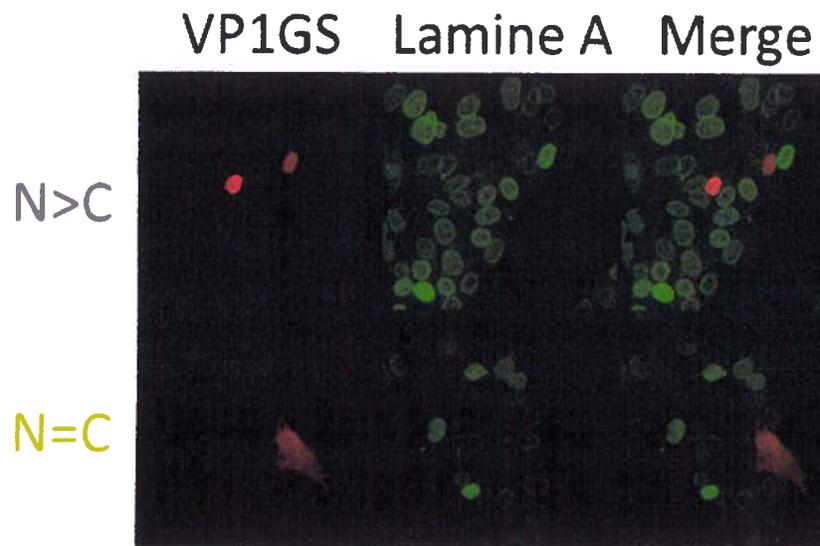
mutants combinés qui possèdent plutôt plusieurs BRs inactivées. Ensuite, les mutants ont été transférés dans un vecteur d'expression de façon à les fusionner au gène de la protéine fluorescente mCherry, préalablement introduit.

La prochaine étape était d'évaluer l'activité de transport nucléaire des différentes BRs de VP1up. Pour ce faire, des cellules PT, c'est-à-dire, des fibroblastes de testicules de porcs, ont été transfectées avec les différents vecteurs d'expression recombinants puis les cellules ont été fixées 24 hr post-transfection. On a alors procédé à un immunomarquage indirecte de la protéine nucléaire lamine A puis les cellules ont été analysées en microscopie à épifluorescence. La distribution intracellulaire des mutants a été observée en rouge grâce à la fluorescence intrinsèque de mCherry tandis que les noyaux des cellules transfectées ont été visualisés en vert en raison du marquage à l'Alexa fluor 488 de l'anticorps secondaire utilisé pour l'immunofluorescence indirecte. Pour chaque mutant, plus de 300 cellules transfectées ont été analysées sur au moins deux expériences indépendantes. Les expériences ont été répétées pour mCherry seule en tant que témoin négatif (pas montré) et pour VP1GSWT comme témoin positif. Deux différents phénotypes étaient observés: majoritairement nucléaire ($N > C$) et diffus ($N = C$). Des exemples de chacun d'entre eux sont démontrés par microscopie confocale (figure 11b). Premièrement, les résultats pour les mutants simples démontrent que l'inactivation simple des BRs affecte faiblement le transport nucléaire de VP1GS, ce qui fournit peu d'informations sur l'importance respective de chacune d'entre elles dans le processus. Par contre, ces résultats suggèrent qu'il y a plus qu'une BR qui possède une forte activité de transport nucléaire (figure 11c). En ce qui concerne les résultats pour les mutants combinés, il est tout d'abord intéressant de constater que l'inactivation combinée des BR1 et BR4 affecte fortement le transport nucléaire de la protéine tout comme pour l'inactivation double des BR1 et BR5 et que les résultats pour ces deux mutants sont pratiquement identiques. De plus, le mutant VP1GSBR1/BR4/BR5 voit son pourcentage de phénotype $N = C$ augmenter d'environ seulement 20% supplémentaire comparativement à

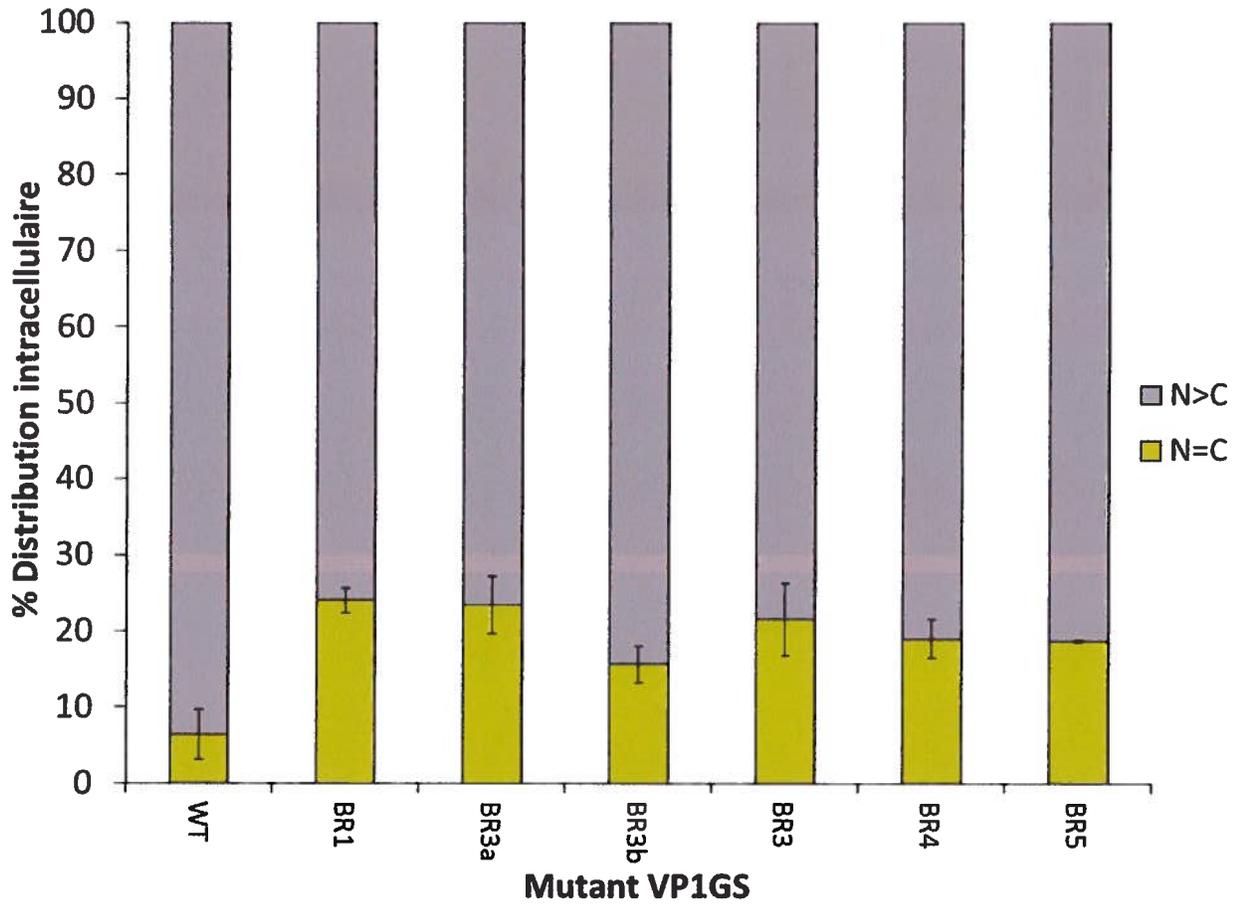
ces derniers. Ainsi, l'inactivation simple de la BR4 ou de la BR5 affecte de façon similaire le transport nucléaire et pratiquement autant que l'inactivation combinée des deux. Ces résultats suggèrent donc que les BR4 et BR5 forment un seul NLS bipartite puisque l'inactivation de l'une ou l'autre des parties mène à l'inactivation totale du NLS ou plus précisément, à la perte d'environ 80% de l'activité du NLS. Aussi, ces résultats démontrent que la BR1 ainsi que le NLS BR4-BR5 possèdent une forte activité de transport nucléaire étant donné que l'inhibition simultanément de leur activité altère de manière importante la localisation nucléaire de VP1GS et ce, bien que l'inactivation simple de l'une d'entre elles n'est peu d'effet. Par la suite, il est intéressant de constater que la BR3 ne semble pas contribuer au transport vers le noyau de la protéine puisque l'inactivation additionnelle de celle-ci chez le triple mutant VP1GSBR1/BR4/BR5 n'amplifie pas l'altération du transport nucléaire. Pour confirmer ce résultat, nous avons vérifié les conséquences de l'inactivation combinée de la BR3 avec l'un ou l'autre des NLSs forts, soit BR1 ou BR4-BR5, sur la localisation nucléaire de VP1GS. En premier lieu, celle-ci n'est pas affectée de façon significative chez le mutant BR1/BR3. En effet, le pourcentage de distribution intracellulaire mixte est près du niveau basal fixé par le témoin positif. Deuxièmement, l'inactivation du NLS bipartite BR4-BR5 altère relativement le transport nucléaire de la protéine et l'inhibition combinée de l'activité de la BR3 n'amplifie pas cet effet. Ainsi, ces résultats suggèrent fortement que la BR3 ne possède pas d'activité de transport nucléaire significative. Finalement, l'inactivation additionnelle de la BR2 a un effet nul sur le ciblage de VP1GS vers le noyau comparativement au quadruple mutant BR1/BR3/BR4/BR5, suggérant que celle-ci contribue faiblement ou pas au transport nucléaire (figure 11d).

Figure 11. Activité de transport nucléaire des régions basiques de VP1up.

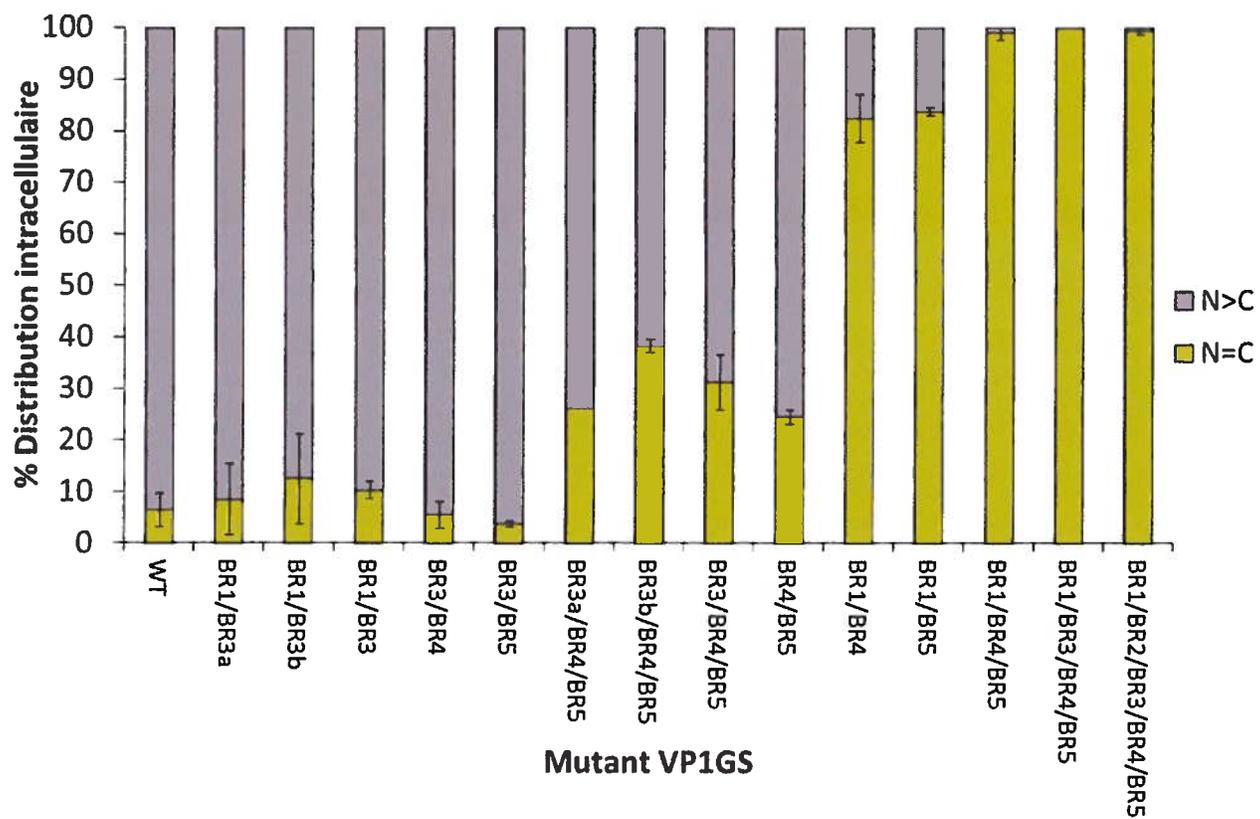
A. Schéma indiquant quels sont les résidus cibles pour la mutagenèse dirigée dans les régions basiques de VP1up. Les cinq régions basiques, BR1 à BR5, sont indiquées. Pour inactiver les BRs, les acides aminés indiqués en rouge ont été remplacés par des résidus polaires hydrophiles neutres par mutagenèse dirigée. R110-R111 et R114-K115 sont les résidus cibles de mutagenèse pour les mutants VP1GSBR3a et BR3b, respectivement. **B.** Exemples des différents phénotypes de distribution intracellulaire des mutants VP1GS. Les mutants ont été fusionnés à la protéine fluorescente mCherry dans un vecteur d'expression. Des cellules PT ont été transfectées et fixées 24 hr plus tard puis immunomarcuées avec un anticorps anti-lamine A de lapin et un anticorps anti-lapin couplé à l'Alexa fluor 488. La distribution intracellulaire des mutants a alors été analysée par microscopie à épifluorescence. Deux phénotypes différents étaient observés : majoritairement nucléaire (N>C) et mixte (N=C). Des exemples de chacun d'entre eux sont démontrés par microscopie confocale. **C.** Analyse de la distribution intracellulaire des mutants simples. Les mutants simples n'ont qu'une seule BR inactivée. **D.** Analyse de la distribution intracellulaire des mutants combinés. Plus d'une BR a été inactivée chez ceux-ci. La nomenclature indique la(les) BR(s) inactivée(s) pour chaque mutant VP1GS et les % représentent les valeurs moyennes provenant de plus de 300 cellules transfectées résultantes d'au moins deux expériences indépendantes (C et D).

A**B**

C



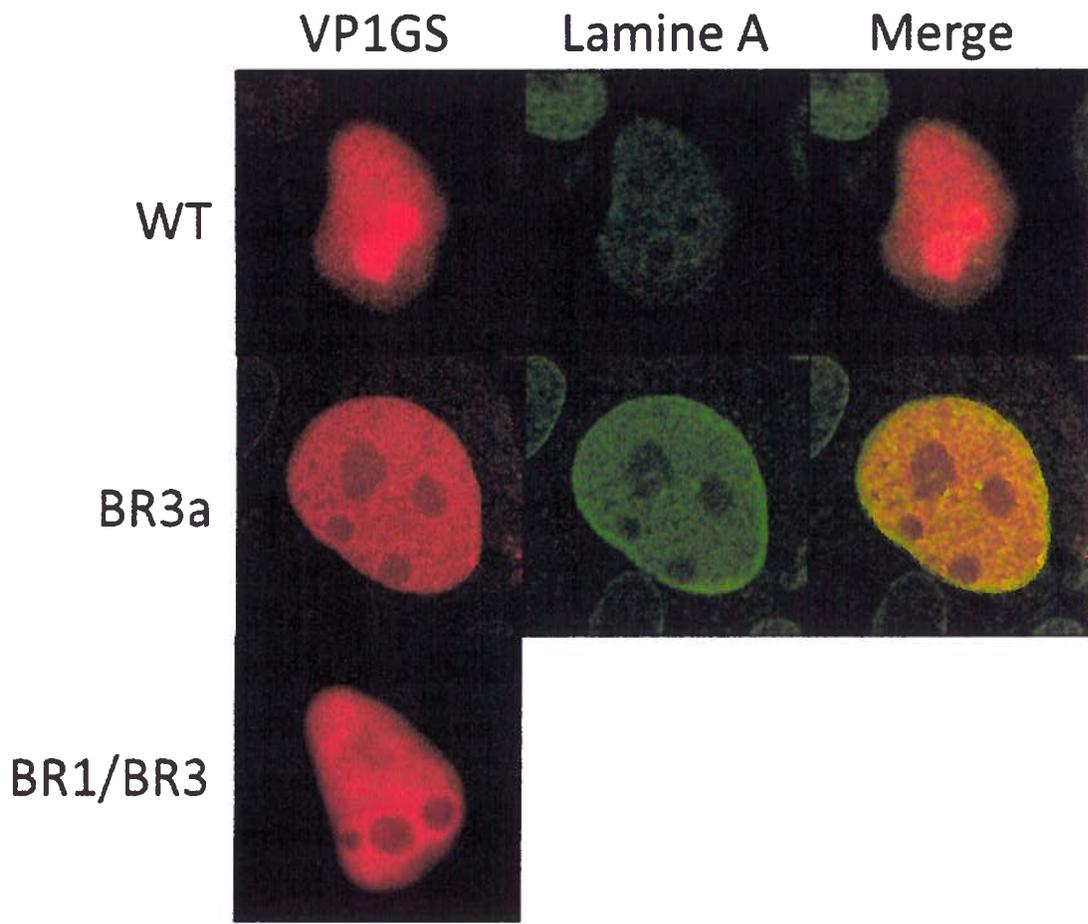
D



2.2 Interactions nucléolaires de VP1 et rôles des régions basiques de VP1_{up}

En poursuivant ces expériences, nous avons eu une surprise de taille. En effet, nous nous sommes aperçus que VP1_{up} se localise naturellement au nucléole. Suite à cette observation, nous avons tout d'abord analysé la distribution intranucléaire des mutants VP1GS et nous avons remarqué que l'inactivation simple ou combinée de certaines régions basiques affectait sa localisation nucléolaire. Plus précisément, deux différents phénotypes étaient observés lorsque les mutations altéraient le ciblage au nucléole. L'un d'entre eux était l'absence de localisation nucléolaire et l'autre était l'accumulation autour du nucléole de la protéine générant ainsi des structures en forme d'anneau. Ces phénotypes étaient entre autres observés chez les mutants BR3a et BR1/BR3, respectivement. Des exemples de chacun des trois phénotypes nucléolaires possibles sont démontrés par microscopie confocale à la figure 12. Dans le cas du troisième phénotype (anneau), nous avons été dans l'incapacité de procéder à la co-localisation avec la lamine A en raison du marquage inefficace de cette dernière et de la rareté du phénotype en question. Il était ainsi difficile de trouver des cellules transfectées réunissant ces conditions (figure 12). Pour chaque mutant, les différents phénotypes n'étaient pas retrouvés aux mêmes ratios dans la population de cellules transfectées. Par contre, nous n'avons pas encore établi précisément les pourcentages respectifs. En conclusion, ces résultats suggèrent donc fortement que certaines BRs possèdent une activité de transport nucléolaire. À ce stade-ci, nous ne pouvons toutefois pas déterminer précisément lesquelles.

Figure 12. Localisation nucléolaire de VP1up et activité de transport nucléolaire de ses régions basiques. Comme décrit à la figure 11. VP1up se localise naturellement au nucléole. Deux différents phénotypes étaient observés lorsque les mutations affectaient la localisation nucléolaire de VP1up : absence de localisation nucléolaire et un anneau autour du nucléole. Des exemples de chacun des phénotypes observés sont démontrés par microscopie confocale. La nomenclature indique la(les) BR(s) inactivée(s) pour chaque mutant VP1GS.

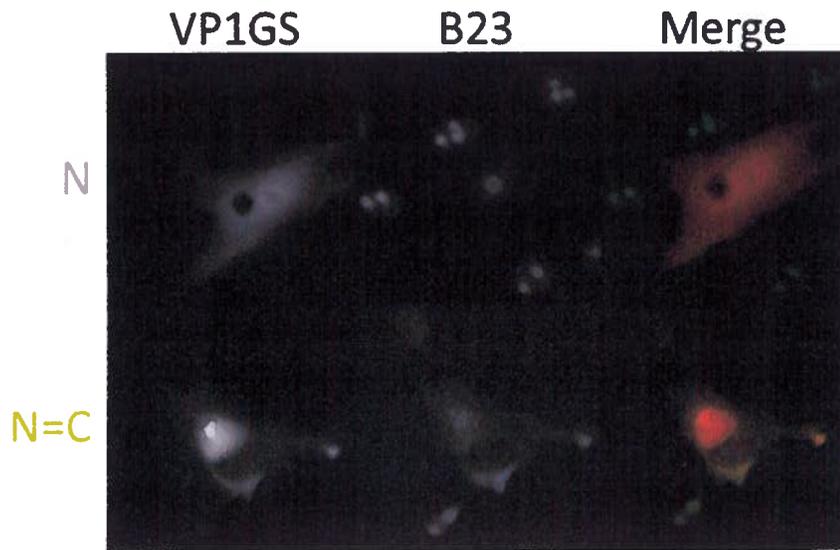
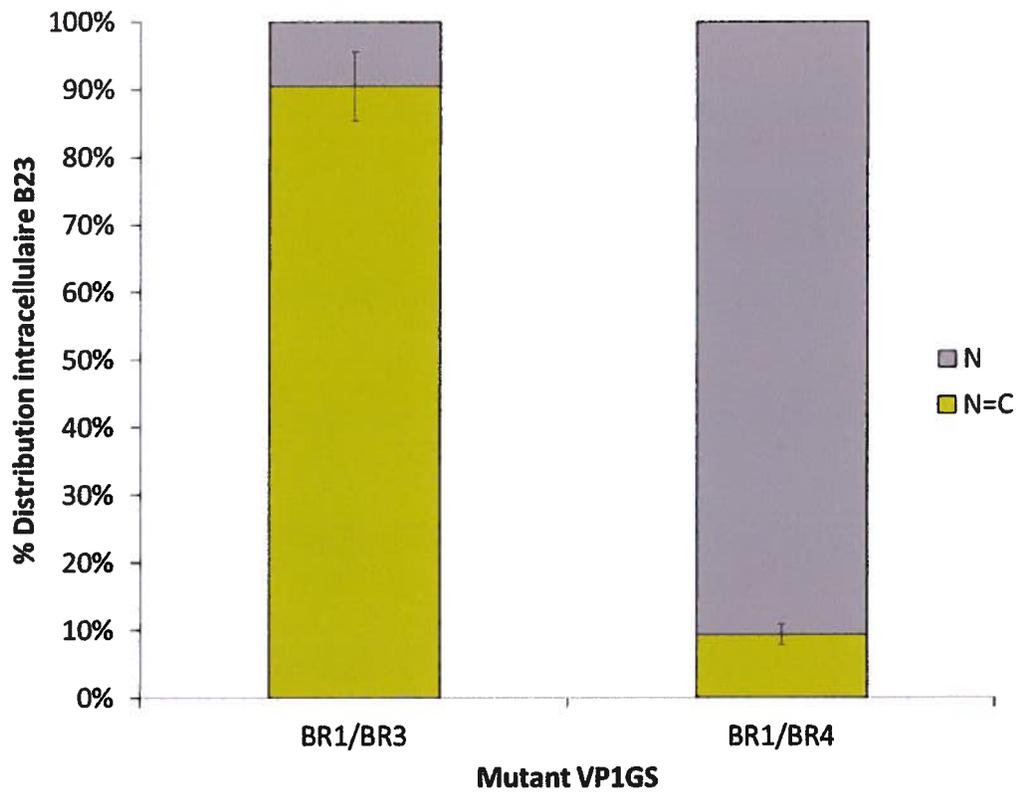


Deuxièmement, suite à l'observation que VP1^{up} se localise au nucléole, nous avons voulu déterminer si elle interagit avec des protéines nucléolaires. Pour ce faire, nous souhaitons vérifier si la localisation de protéines du nucléole était altérée suite à l'expression de mutants VP1GS chez lesquels la localisation nucléolaire était affectée. Cette étude a été confiée à Maude Boisvert et les expériences ont débuté avec la protéine nucléolaire multifonctionnelle nucléophosmine/B23.

Ainsi, 24 hr post-transfection des cellules avec les mutants BR1/BR3 et BR1/BR4, nous avons procédé à un immunomarquage indirect de la B23, l'anticorps secondaire utilisé étant couplé à l'Alexa fluor 488. Les cellules ont été observées en microscopie à épifluorescence et la distribution intracellulaire de la B23 et des mutants a alors été analysée. Ce que nous avons plutôt remarqué, c'est que chez les cellules transfectées, deux phénotypes de la B23 étaient observés : soit elle demeurait fortement associée au noyau/nucléole (N) ou, de façon surprenante, parfois lorsque le mutant avait une localisation diffuse, elle présentait conjointement une telle localisation (N=C). Des exemples de chacun des phénotypes sont démontrés à la figure 13a. L'observation du deuxième phénotype (N=C) pointait une possible interaction entre ces deux protéines. Pour confirmer notre hypothèse, nous avons procédé à l'analyse de la co-localisation de mutants avec phénotype diffus et de la B23. Ainsi, nous avons déterminé les pourcentages de distribution intracellulaire de la B23 dans la population de cellules avec phénotype mixte des mutants VP1GSBR1/BR3 et BR1/BR4. Les résultats découlent de l'analyse respective de 80 et de 185 cellules provenant de deux expériences indépendantes. Ces expériences ont confirmé que VP1GS, dans le cas d'un phénotype de distribution intracellulaire diffus, se localise B23 de façon diffuse aussi mais que, de façon intéressante, cet effet dépend du mutant exprimé. Effectivement, dans le cas du mutant BR1/BR3, B23 a une localisation diffuse chez environ 90% des cellules tandis que pour le mutant BR1/BR4, à peu près seulement 10% des cellules présentent une telle

localisation. En regard à ces résultats préliminaires, notre hypothèse est que VP1up interagit avec B23 et ce via la BR4 (figure 13b).

Figure 13. Interaction de VP1up avec la protéine nucléolaire nucléophosmine/B23 et implication de ses régions basiques. A. Exemples des différents phénotypes de distribution intracellulaire de la nucléophosmine/B23 suite à l'expression de mutants VP1GS. Les mutants ont été fusionnés à la protéine fluorescente mCherry dans un vecteur d'expression. Des cellules PT ont été transfectées et fixées 24 hr plus tard puis immunomarquées avec un anticorps anti-B23 de souris et un anticorps anti-souris couplé à l'Alexa fluor 488. La distribution intracellulaire de la B23 et des mutants a alors été analysées par microscopie à épifluorescence. Deux phénotypes différents de la B23 étaient observés dans la population de cellules transfectées: demeure fortement associée au noyau/nucléole (N) ou est relocalisée de façon diffuse (N=C) en association avec un phénotype également mixte de VP1GS. Des exemples de chacun d'entre eux sont démontrés par microscopie à épifluorescence. **B.** Analyse de la co-localisation de mutants avec phénotype diffus et de la protéine nucléolaire B23. La nomenclature indique les BRs inactivées pour chaque mutant VP1GS et les % représentent les valeurs moyennes provenant de 80 (BR1/BR3) et de 185 (BR1/BR4) cellules résultantes de deux expériences indépendantes. Seules les cellules transfectées chez lesquelles les mutants avaient un phénotype diffus ont été comptabilisées.

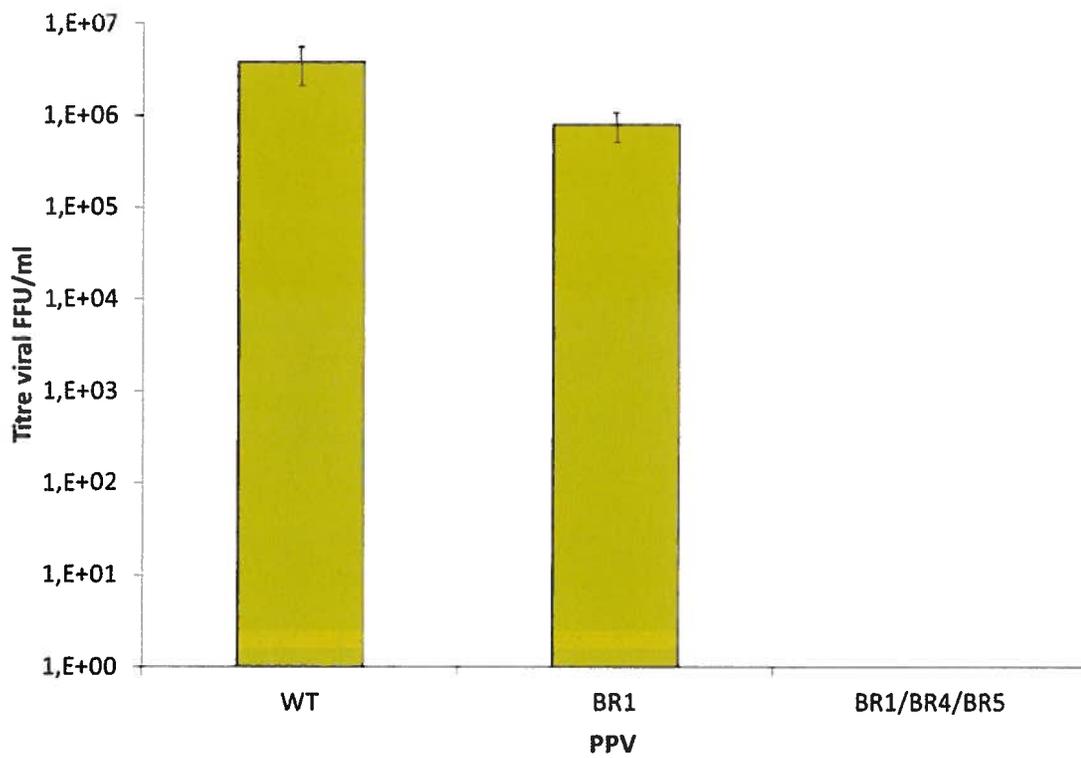
A**B**

2.3 Rôles dans le cycle viral des régions basiques de VP1up

Nous souhaitons procéder à l'insertion des mutations BRs intéressantes dans un clone infectieux du PPV afin de mieux comprendre les rôles des NLSs de VP1up dans le cycle viral. Ainsi, pour débiter, les mutations BR1 et BR1/BR4/BR5 ont été transférées dans le clone infectieux du PPV pNO de souche NADL-2 (pNO-N2) et la caractérisation des clones infectieux mutants a été réalisée en collaboration avec Maude Boisvert.

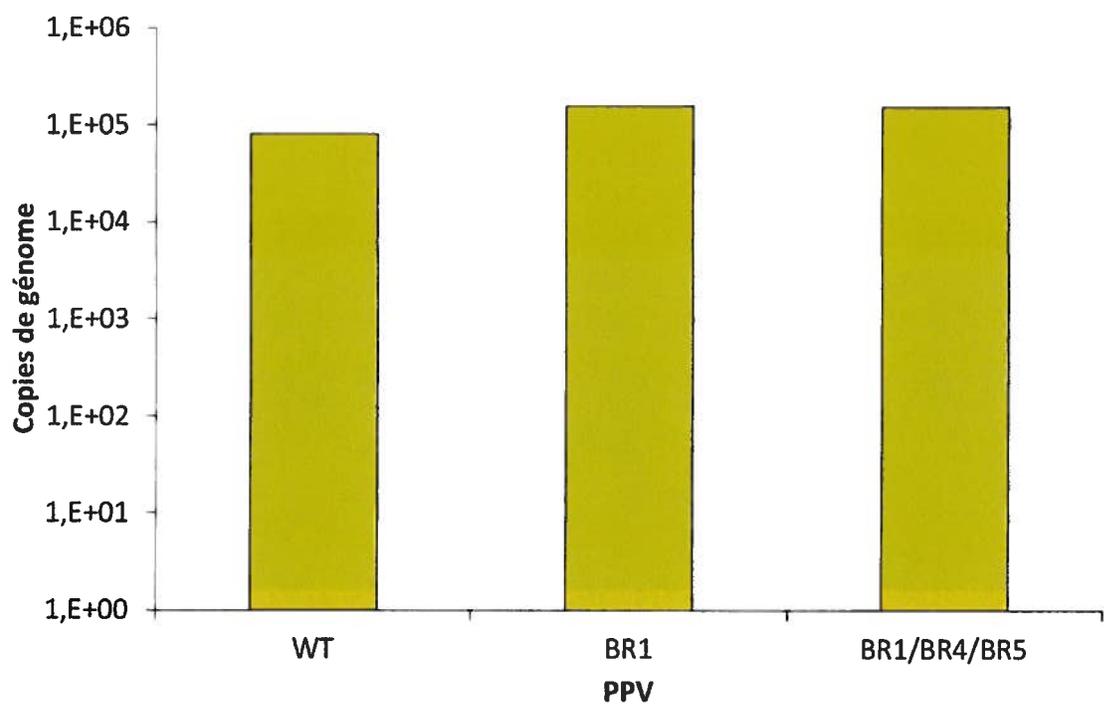
En premier lieu, nous avons procédé à l'analyse de la production de particules virales infectieuses pour les mutants BR1 et BR1/BR4/BR5 du PPV afin d'évaluer l'importance des NLSs de VP1up dans l'infectivité. Des cellules ont été transfectées avec les deux clones puis, 48 hr plus tard, des cellules ont été infectées avec le surnageant des transfections. Six jours post-transfert, le surnageant a été titré par immunofluorescence avec l'anticorps spécifique à la capsidie après 20 hr d'infection. Les titres ont été déterminés par le nombre de foyers fluorescents par mL (FFU/mL), le seuil de détection étant de 1000 FFU/mL. Des cellules PT ont été utilisées à toutes les étapes et l'expérience a été réalisée en duplicata. De plus, lors de celle-ci, le pNO-N2WT a été utilisé en tant que témoin positif. Ainsi, le mutant BR1 est légèrement moins infectieux que le virus de type sauvage tandis que le triple mutant BR1/BR4/BR5, chez lequel les deux NLSs sont inactivés, est très peu ou pas infectieux, son titre viral étant en dessous du seuil de détection. Ainsi, les deux NLSs, soit BR1 et BR4-BR5, ou minimalement l'un d'entre eux, sont requis pour l'infectivité, ce qui signifie qu'ils jouent tous les deux un rôle important dans l'infection (figure 14).

Figure 14. Importance des NLSs de VP1up dans l'infectivité. Les mutations BR1 et BR1/BR4/BR5 ont été insérées dans le clone infectieux du PPV pNO NADL-2 (pNO-N2). Des cellules ont été transfectées puis le surnageant a été utilisé pour infecter des cellules 48 hr post-transfection. La production de particules virales infectieuses a été analysée par titrage par immunofluorescence du surnageant, six jours après le transfert, via l'anticorps anti-capside 20 hr post-infection. Toutes les manipulations ont été effectuées avec des cellules PT. La nomenclature indique la(les) BR(s) de VP1up inactivée(s) pour chaque mutant du PPV et les titres viraux sont donnés par unité de foyers fluorescents par mL (FFU/mL), le seuil de détection étant de 1000 FFU/mL. L'expérience a été réalisée en duplicata.



En second lieu, nous avons analysé la production virale pour les mutants du PPV dans le but d'estimer l'importance des NLSs de VP1_{up} dans les étapes tardives d'infection. Pour ce faire, des cellules PT ont été transfectées avec chacun des clones infectieux du PPV et les cellules ont été lysées 24 ou 48 hr post-transfection. Par la suite, une immunoprécipitation (IP) des capsides a été réalisée avec un anticorps anti-capside (3C9). Enfin, le nombre de copies génomiques encapsidées a été déterminé par qPCR en utilisant des amorces spécifiques au PPV. Le pNO-N2WT représente le témoin positif. Comme prévue, la mutation BR1 n'affecte pas la production virale. En effet, le nombre de copies de génome pour le mutant BR1 du PPV est équivalent à celui du virus sauvage. Ce résultat était bien entendu prévisible étant donné l'infectivité de ce mutant, démontrée par les expériences précédentes. Par contre, de façon intéressante, la production virale n'est également pas affectée par l'inhibition de l'activité des deux NLSs. Ainsi, il y a bel et bien production de particules virales pour le triple mutant, toutefois, celles-ci ne sont pas infectieuses, comme établi antérieurement. En conclusion, nous pouvons donc affirmer que ces régions basiques de VP1_{up} sont cruciales pour les étapes d'entrée, c'est-à-dire, préalablement à l'internalisation nucléaire (figure 15).

Figure 15. Importance des NLSs de VP1up dans les étapes tardives d'infection. Les mutations BR1 et BR1/BR4/BR5 ont été transférées dans le clone infectieux du PPV pNO NADL-2 (pNO-N2). Les clones infectieux ont été transfectés dans des cellules PT et celles-ci ont été lysées 48 hr plus tard. On a alors procédé à une IP des capsides sur le lysat cellulaire à l'aide de l'anticorps anti-capside 3C9-D11-H11. L'encapsidation génomique a été quantifiée par qPCR ciblant le génome du PPV afin d'évaluer la production virale. La nomenclature indique la(les) BR(s) de VP1up inactivée(s) pour chaque mutant du PPV.



DISCUSSION

1. Activité phospholipase A₂ sécrétée de VP1up

1.1 L'instabilité de la VP1up nuit aux études structurales

Les protéines VP2 et VP3, cette dernière étant générée lors des étapes précoces d'infection suite au clivage de VP2, sont les principales constituantes de la capside du PPV (Tsao *et al.*, 1991). La protéine VP1, quant-à-elle, correspond à environ 10 à 20% de sa composition. La séquence de celle-ci est identique à celle de VP2 à l'exception d'une extension de 150 résidus en N-terminal (VP1up). Les particules virales ne possédant pas cette région sont défectueuses au niveau des étapes précoces d'infection, notamment en raison de l'absence de l'activité pvPLA₂ (Canaan *et al.*, 2004; Zádori *et al.*, 2001). Cette enzyme extrêmement conservée dans la famille des *Parvoviridae* est très apparentée aux sPLA₂s et c'est la première fois qu'une telle activité est décelée dans la capside d'un virus. Par contre, malgré les nombreuses similitudes qui unissent l'enzyme virale à ce groupe de PLA₂, plusieurs différences mettent en lumière sa structure unique. Entre autres, les sPLA₂s sont reconnues pour posséder de nombreux ponts disulfures, contrairement à la pvPLA₂. De plus, un bon nombre d'inhibiteurs connus de celles-ci n'ont pas d'activité sur l'enzyme virale, ce qui signifie que la structure de son site actif est différente. Pour ces raisons, nous désirions obtenir sa structure 3D. En effet, de telles informations faciliteraient l'obtention d'inhibiteurs potentiels ainsi que l'optimisation de l'un d'entre eux et donc, le développement d'un inhibiteur spécifique en tant que nouvelle classe de drogue antivirale.

La structure de la capside du PPV, ainsi que celle de nombreux autres parvovirus, a été obtenue par cristallographie aux rayons-X (Agbandje-McKenna *et al.*, 1998; Agbandje *et al.*, 1993; Chapman et Rossmann, 1996; Simpson *et al.*, 2002; Tsao *et al.*, 1992; Wu et Rossmann, 1993; Xie et Chapman, 1996). Toutefois, VP1up n'est pas visible sur les images ainsi obtenues puisqu'elle n'est pas accessible à la surface des particules nouvellement formées. En effet, elle

est externalisée uniquement en cours d'infection, probablement dans la voie endosomale suite à l'acidification des vésicules. D'ailleurs, le rôle de la pvPLA₂ se situe au niveau de l'évasion des virions de cette voie. Ainsi, il est possible que l'externalisation soit coordonnée avec le moment où l'activité de l'enzyme est requise afin d'éviter la toxicité qu'elle pourrait conférer à la cellule. De plus, des essais de cristallographie aux rayons-X ont également été réalisés sur la protéine VP1up exprimée seule mais sans générer de résultats. Nous avons donc opté pour la RMN afin de renouveler la tentative d'élucidation de sa structure. Seul un court fragment de VP1up, VP1M33, comprenant le domaine enzymatique, a été exprimé dans le but d'obtenir une meilleure résolution du motif enzymatique. La protéine pure à environ 99% a été obtenue en grande quantité, soit approximativement 4 mg/litre de culture et plusieurs spectres RMN ont été acquis. Malheureusement, de nombreux problèmes sont survenus lors des essais, compromettant ainsi l'obtention de la structure.

La nature des problèmes rencontrés lors de l'acquisition des spectres et le fait que ceux-ci n'étaient pas dépendants des conditions testées nous permettent de penser que c'est l'instabilité de cette région, due à l'absence de ponts disulfures, qui explique les difficultés encourues à élucider la structure de ce domaine enzymatique, autant par cristallographie que par RMN. D'ailleurs, cette région pourrait être naturellement flexible afin de favoriser son externalisation. Ainsi, l'insertion de cystéines dans des endroits stratégiques, menant à la stabilisation de la structure via la formation de ponts disulfures, pourrait possiblement faciliter les études structurales de ce domaine de VP1up. Nous avons obtenu une prédiction de la structure 3D de la PLA₂ virale du PPV/B19 par modélisation à partir de l'homologie entre la pvPLA₂ et les sPLA₂s. De façon intéressante, les régions cibles pour l'insertion de cystéines pourraient être déterminées à partir de cette prédiction. Plus précisément, les cystéines seraient insérées au niveau de régions conservées entre les groupes I/II et III aux endroits où elles sont habituellement retrouvées. Des essais enzymatiques seraient alors nécessaires afin de s'assurer que la pvPLA₂ est active et ainsi vérifier que la structure est

demeurée intacte. Aussi, l'expression devrait avoir lieu en cellules eucaryotes pour permettre la formation des ponts disulfures grâce à la présence d'isomérase.

Aussi, il est possible que le remplacement de codons associés à des tRNAs rares par des codons plus facilement traduits puisse affecter le repliement de la protéine et donc, sa stabilité. En effet, au niveau du ribosome, l'activité de synthèse protéique du centre peptidyl-transférase est couplée au repliement et au ciblage des protéines nouvellement traduites et de nombreux mécanismes permettent d'ajuster la vitesse de traduction à chacun de ces processus. La présence de structures stables locales ou de codons rares ou lents dans l'ARNm peut modifier le taux de synthèse et ces variations dans la vitesse peuvent avoir des effets importants sur l'efficacité du repliement protéique. Ainsi, le fait d'avoir optimisé la séquence du fragment d'intérêt, dans le but de favoriser son expression en bactérie *E.coli*, a pu contribuer à l'instabilité de la protéine en influençant sa vitesse de traduction. En effet, pour cette raison, celle-ci a pu adopter plusieurs structures ou se replier de manière inappropriée (Kramer *et al.*, 2009). L'optimisation d'un système d'expression ne nécessitant pas la modification de la séquence du gène de VP1M33 serait donc peut-être à envisager.

2. Régions basiques de VP1up

2.1 VP1up possède deux NLSs majeurs

Les protéines de la capsidie doivent cibler le noyau à deux étapes du cycle viral, lors du transport nucléaire des virions initiant l'infection et lors du retour vers le noyau des protéines synthétisées *de novo*. VP2 ne contient aucun NLS mais elle possède néanmoins un domaine de transport nucléaire (NLM) structuré qui est formé suite à la trimérisation de protéines structurales. Ce dernier initie autant l'import nucléaire de sous-unités VP2 exprimées seules que d'oligomères

VP1/VP2. Par contre, ce domaine riche en acides aminés basiques est localisé au niveau de la surface interne de la capsidie et ne joue donc pas de rôle dans les étapes précoces d'infection n'étant pas accessible chez les particules nouvellement formées. Néanmoins, la séquence VP1-spécifique possède de nombreux domaines basiques, fortement conservés parmi les parvovirus, qui se comportent comme des NLSs classiques permettant, entre autres, l'import nucléaire des particules nouvellement formées. En effet, le CPV possède une séquence homologue au groupement basique 1 (BC1) du MVM, requise pour les étapes précoces dans le contexte normal d'infection, et il a précédemment été démontré qu'un peptide correspondant à celle-ci était suffisant pour assurer le transport nucléaire d'une protéine hétérologue. Par contre, des peptides correspondant aux autres BCs du virus murin n'étaient pas actifs dans des essais de microinjections (Vihinen-Ranta *et al.*, 1997). De façon similaire, la translocation au noyau de la VP1 du MVM est principalement garantie par le BC1 et le domaine NLM placés à chacune des extrémités du polypeptide, tandis que le BC2 est requis à un degré inférieur pour la capacité de transport nucléaire totale. Aussi, les BC3 et BC4 ne démontrent pas d'activité de transport nucléaire de VP1 dans le contexte du génome complet bien que les quatre BCs soient absolument requis pour l'infectivité, possiblement pour l'import nucléaire des virions initiant l'infection (Lombardo *et al.*, 2002).

La VP1_{up} du PPV possède, quant-à-elle, cinq régions basiques (BR) pouvant potentiellement se comporter comme des NLSs, celles-ci exhibant d'ailleurs une forte homologie de séquence avec les BCs du MVM, à l'exception de la BR3. En effet, les BR1 et BR2 correspondent aux BC1 et BC2, respectivement. Pour leur part, les BR4 et BR5, sont conservées, mais avec moins d'homologie, avec les BC3 et BC4. Aussi, ces régions, accessibles uniquement suite à l'externalisation de VP1_{up}, possèdent la séquence consensus associée à des NLSs classiques monopartites dans le cas des BR1 à BR3 et bipartites en ce qui concerne les BR4 et BR5, ces dernières étant séparées par un court espaceur de six acides aminés. Des expériences de mutagenèse dans les BRs et de microscopie à

fluorescence sur les protéines de fusion exprimées seules ont permis de démontrer que les BR4 et BR5 forment effectivement un NLS bipartite et que ce dernier ainsi que la BR1 possède une forte activité de transport nucléaire, contrairement aux BR2 et BR3 qui n'étaient pas impliquées dans l'import nucléaire des protéines recombinantes. Ainsi, les résultats suggèrent fortement que VP1up possède deux NLSs majoritaires, BR1 et BR4-BR5. Toutefois, des expériences supplémentaires sont nécessaires afin de confirmer les résultats concernant les BR2 et BR3. La BR2 a seulement été étudiée en combinaison avec l'inactivation de toutes les régions basiques et son introduction chez d'autres mutants d'intérêts pourrait effectivement mettre en évidence un rôle mineur de cette région dans le transport nucléaire. De plus, de façon intéressante, le transport vers le noyau des protéines de fusion n'était jamais totalement inhibé, comme démontré par l'absence de phénotype de distribution intracellulaire cytoplasmique et ce, même pour le mutant ayant vu ses cinq régions basiques inactivées. L'ajout d'un troisième phénotype (N<C) pourrait apporter certaines subtilités aux résultats, de manière à également démontrer une faible importance de la BR2 dans le processus mais aussi de la BR3. Nos hypothèses quant à cette observation sont, tout d'abord, la diffusion à travers les NPCs en raison d'une masse moléculaire inférieure à leur limite de transport passif. En effet, les molécules dont le poids est plus petit que 40 à 50 kDa peuvent traverser passivement le canal et la VP1up couplée à la mCherry possède une masse moléculaire d'environ 46 kDa. Il serait donc intéressant de fusionner une deuxième mCherry aux mutants intéressants et de vérifier s'ils sont alors retenus au cytoplasme. En deuxième lieu, il est aussi possible que les mutations introduites n'aient que partiellement inactivées les régions ciblées puisque certains résidus basiques demeurent pour chacune d'entre elles. Ainsi, si les expériences impliquant une seconde mCherry ont un dénouement négatif, nous pourrions procéder à l'introduction supplémentaire de mutations dans les BRs ou plutôt à des délétions de ces dernières chez les mutants d'intérêts. Enfin, le fait que les séquences basiques soient fortement conservées parmi les parvovirus et que ces régions aient une forte homologie avec le NLS consensus

qui lie les récepteurs α/β karyopherin suggère fortement que ces virus utilisent les facteurs de la voie classique de transport nucléaire pour assurer le ciblage vers le noyau à différentes étapes du cycle viral.

2.2 VP1up interagit avec le nucléole

De façon forte intéressante, la poursuite de ces expériences a mis en lumière la localisation nucléolaire de VP1up. Le noyau est une structure hautement ordonnée contenant plusieurs sous-compartiments non-membranaires et le nucléole correspond à la plus large structure sous-nucléaire. Le nucléole est morphologiquement divisé en plusieurs régions dont le centre fibrillaire (DFC) et le composant granulaire (GC) (Emmott et Hiscox, 2009). Dans les dernières années, plusieurs fonctions ont été attribuées au nucléole incluant la biogenèse des ribosomes, c'est-à-dire la synthèse, les modifications et l'assemblage. Aussi, il joue un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire en étant un site de modifications post-traductionnelles de protéines, par exemple, de phosphorylations et de sumoylations. En troisième lieu, ce sous-compartiment nucléaire est également impliqué dans les réponses au stress cellulaire. En effet, il peut séquestrer la protéine apoptotique p53 et réguler la transcription de l'ADN ribosomique (ADNr) (Banerjee *et al.*, 2005; Otsuka *et al.*, 2000; Realdon *et al.*, 2004). De plus, le nucléole peut être la cible d'infection virale, en autres, par le coronavirus IBV (infectious bronchitis virus) et par le virus de l'herpès simplex (HSV) (Bertrand et Pearson, 2008; Dove *et al.*, 2006; Hiscox, 2007; Lymberopoulos et Pearson, 2007). Dans cette étude, nous avons démontré pour la première fois une interaction parvovirus/nucléole, à l'exception de l'AAV non-autonome, en mettant en évidence la localisation nucléolaire de VP1up (Bevington *et al.*, 2007; Qiu et Brown, 1999; Wistuba *et al.*, 1997). Le ciblage nucléolaire de protéines dépend de la présence d'un signal de localisation nucléolaire (NoLS) ou, en absence de ce dernier, d'interactions avec des acides nucléiques ou avec d'autres protéines contenant-NoLS (Emmott et Hiscox, 2009). Nous avons également démontré que certaines BRs possèdent une

activité de transport nucléaire et par conséquent, correspondent à des NoLS. Toutefois, des expériences supplémentaires seront nécessaires pour déterminer l'importance respective de celles-ci dans la localisation nucléolaire de VP1up. De façon intéressante, les BR1 et BR5 possèdent le motif NoLS consensus R/K-R/K-X-R/K, une attention particulière pourrait donc être accordée à celles-ci (Emmott et Hiscox, 2009; Lohrum *et al.*, 2000). Ensuite, nous avons démontré que VP1up interagit avec la nucléophosmine/B23 et que la BR4 semble impliquée dans cette interaction. La phosphoprotéine multifonctionnelle B23 se localise dans le GC nucléolaire et effectue la navette entre le cytoplasme et le noyau. Elle possède des fonctions dans la biogenèse des ribosomes et la duplication des centrosomes, en plus d'assurer un rôle de chaperone. Dans un travail futur, on pourrait confirmer l'interaction VP1-B23 par co-immunoprécipitation (co-IP) et/ou «pull-down». L'importance des BRs pour cette interaction devra également être davantage étudiée, par exemple en analysant la co-localisation de différents mutants et de B23 et en confirmant par co-IP. Aussi, d'autres interactions VP1-protéines nucléolaires pourraient être déterminées en procédant à une IP avec VP1 sur des nucléoles purifiés et en identifiant les candidats par spectrométrie de masse. Enfin, l'importance des fonctions du nucléole pour l'infection restent à être déterminées. Une hypothèse est qu'elles favorisent la réplication virale via la prolongation de la phase S. D'ailleurs, il est possible que l'interaction VP1-B23 vise à séquestrer au nucléole cette protéine essentielle à la régulation du cycle et à la prolifération cellulaire pour cette raison. Aussi, le virus pourrait cibler le nucléole afin d'inhiber les réponses de stress cellulaire. Dans tous les cas, les interactions virus-nucléole semblent requises tôt dans l'infection et comme certaines BRs correspondent à des NoLS, il est logique de penser que les rôles de celles-ci se situent notamment au niveau des étapes précoces d'infection.

2.3 Les NLSs sont cruciaux au niveau des étapes précoces d'infection

Afin de mieux comprendre les rôles des NLSs dans le contexte de l'infection, les clones infectieux du PPV mutants BR1 et BR1/BR4/BR5 ont été générés et

l'obtention des mutants BR4/BR5, BR1/BR4, BR1/BR5, BR1/BR3, BR3/BR4/BR5 et BR1/BR3/BR4/BR5 est présentement en cours. Les résultats préliminaires de titrages ont ensuite permis de démontrer que les deux domaines de transport nucléaire sont cruciaux à l'infectivité. Ces expériences devront également être réalisées pour les autres mutants du PPV afin de confirmer ces résultats et les conclusions tirées précédemment. Ainsi, les virions dont les BR4 et BR5 sont inactivés ainsi que les mutants BR1/BR3 et BR3/BR4/BR5 devraient obtenir des titres équivalents à ceux du mutant BR1 tandis que les mutants BR1/BR4, BR1/BR5 et BR1/BR3/BR4/BR5 devraient titrer sous le seuil de détection, tout comme le mutant BR1/BR4/BR5. Par la suite, des expériences post-transfection de qPCR sur les capsides ont été débutées et les premiers résultats suggèrent fortement que les NLSs ne sont pas requis pour le retour des protéines structurales vers le noyau suite à leur traduction et leur trimérisation cytoplasmique. La poursuite de cette analyse pour les autres clones infectieux devrait démontrer que la production de nouveaux virions n'est également pas affectée chez ceux-ci. Aussi, la distribution des protéines structurales aurait pu être vérifiée post-transfection par immunofluorescence via l'anticorps 3C9, qui reconnaît les capsides vides et pleines, et l'anticorps dirigé contre VP2, qui sonde les VPs libres et les capsides pleines, dans le but de confirmer que celles-ci n'accumulent pas dans le cytoplasme. De plus, il serait intéressant d'analyser la réplication de l'ADN viral après un cycle d'infection par qPCR de manière à confirmer que les domaines de transport nucléaire sont importants pour les étapes précoces d'infection. Les clones pourraient être également caractérisés en termes de synthèse de protéines structurales, c'est-à-dire par immunobuvardage de type western grâce à un anticorps anti-VP2 20 heures post-infection. Ainsi, un taux élevé de VP2 indiquerait que le génome viral a été délivré au noyau. Enfin, la région BR2 devra aussi être davantage investiguée dans le contexte d'infection pour éclaircir son implication dans le cycle viral. En conclusion, les deux NLSs de VP1_{up} du PPV sont absolument requis pour la production de particules virales infectieuses et jouent un rôle dans les étapes

précoces d'infection en permettant le transport des virions jusqu'à leur lieu de répllication, le noyau.

CONCLUSION

La capside du PPV est composée des protéines structurales VP1, VP2 et VP3, cette dernière étant produite en cour d'infection par le clivage de VP2. VP1 et VP2 sont produites par épissage alternatif de leur séquence commune. La VP1 possède une région unique (VP1up), non-partagée avec la VP2, située en N-terminal jouant un rôle primordial dans l'infectivité. Cette séquence se caractérise par la présence d'un domaine phospholipase A₂ sécrétée (sPLA₂), une activité qui est pour la première fois décelée dans la capside d'un virus. L'enzyme virale (pvPLA₂) est absolument requise pour les étapes précoces d'infection et, bien qu'apparentées aux sPLA₂s, possède de nombreuses propriétés enzymatiques et structurales qui la différencient de ces dernières. De plus, VP1up possède cinq régions basiques (BRs) pouvant potentiellement correspondre à des NLSs contribuant à son importance dans l'établissement d'une infection productive. Cette étude comportait deux volets, le premier portant sur la pvPLA₂ tandis que le second était spécifique aux BRs. Plus précisément, les objectifs étaient d'élucider la structure 3D de l'enzyme virale par résonance magnétique nucléaire (RMN), de déterminer si les BRs possèdent une activité de transport nucléaire puis d'évaluer leurs rôles dans le contexte d'infection.

Tout d'abord, un fragment de VP1up incluant la région pvPLA₂ a été exprimé et purifié puis soumis à des essais de RMN. Le rendement de production et la pureté de la protéine étaient excellents. Toutefois, les essais n'ont pas été concluants et nous avons donc été incapables d'obtenir la structure du domaine enzymatique. Nous avons deux hypothèses quant aux causes responsables des difficultés rencontrées. Premièrement, l'instabilité de la protéine, due à l'absence de ponts disulfures, pourrait être un facteur important défavorable aux études structurales. Il serait donc intéressant de stabiliser la structure par insertion de cystéines dans des endroits stratégiques. Aussi, l'optimisation du gène pour l'expression en bactéries *E.coli* aurait également pu nuire à cette étude en contribuant à l'instabilité de la protéine. En effet, le remplacement de codons associés à des tRNAs rares par des codons plus fréquents peut altérer le repliement du polypeptide en augmentant sa vitesse de synthèse. Ainsi,

l'optimisation d'un autre système d'expression ne requérant pas cette étape serait d'intérêts.

Deuxièmement, de la mutagenèse dirigée a été réalisée dans les BRs puis les mutants ont été fusionnés à la protéine fluorescente mCherry dans un vecteur d'expression. Des expériences de microscopie à fluorescence ont alors permis de démontrer que les BR4 et BR5 forment un seul NLS bipartite avec forte activité de transport nucléaire. Aussi, la BR1 correspond à un NLS majeur tandis que la BR3 n'est pas impliquée dans le ciblage au noyau de la protéine. Les résultats préliminaires concernant la BR2 suggèrent fortement que celle-ci ne joue également pas un rôle dans le processus. Toutefois, des expériences supplémentaires seront nécessaires pour confirmer ce résultat. Enfin, nous avons remarqué qu'en aucun cas les mutations inhibaient totalement le transport nucléaire et nous pensons que la diffusion passive des protéines de fusion à travers les NPCs et/ou l'inhibition partielle des BRs pourraient être en jeu. La fusion d'une seconde mCherry et/ou l'inhibition totale des NLSs par délétions ou par mutagenèse des résidus basiques résiduels pourraient donc facilement contrer le phénomène.

De façon surprenante, en étudiant les BRs, nous avons déterminé que VP1up se localise naturellement au nucléole et que certaines BRs agissent en tant que NoLS. Toutefois, une analyse plus approfondie sera nécessaire pour identifier clairement les BRs impliquées dans cette localisation. Par contre, les résultats préliminaires suggèrent que la BR4, du moins, joue un rôle en assurant une interaction avec la protéine nucléolaire nucléophosmine/B23. Cette interaction devra être confirmée par co-immunoprécipitation et/ou «pull-down». Bien que les premiers résultats suggèrent que les BR1 et BR3 ne sont pas importants pour cette interaction, le rôle des BRs dans celle-ci pourra être davantage investigué via des expériences supplémentaires de co-localisation entre différents mutants et B23. Aussi, il serait intéressant d'identifier d'autres interactions VP1-protéines

nucléolaires. Enfin, l'importance des interactions virales avec le nucléole pour l'infection reste à être précisée.

Les mutations intéressantes ont par la suite été transférées dans un clone infectieux du PPV et l'analyse préliminaire de la production de particules virales infectieuses par titrage suggère que les deux NLSs sont cruciaux pour l'infectivité. Des qPCRs sur les capsides ont, quant-à-eux, permis de démontrer que leurs rôles se situent au niveau des étapes précoces d'infection. Toutefois, les expériences ont été réalisées uniquement avec les mutants du PPV BR1 et BR1/BR4/BR5. Elles devront donc être répétées avec les autres clones infectieux d'intérêts afin de confirmer les résultats obtenus. La caractérisation des mutants pourrait également être poursuivie, par exemple, en analysant la distribution et la synthèse des protéines structurales par immunofluorescence et par immunobuvardage de type western, respectivement, ainsi que la réplication virale par qPCR afin de les valider.

En perspectives, il serait intéressant de caractériser fonctionnellement la pvPLA₂, c'est-à-dire, d'identifier les acides aminés critiques, autant pour le site actif que le site d'attachement aux membranes, et de déterminer son rôle dans le cycle viral. De plus, étant donné son importance dans l'infectivité, l'obtention d'un inhibiteur spécifique représenterait un avancement majeur dans la lutte contre les infections au parvovirus et également les maladies associées. Aussi, il serait intéressant de procéder à la caractérisation des interactions entre le virus et le nucléole. Plus précisément, de déterminer s'il y a modification du nucléole pendant l'infection, si d'autres protéines virales interagissent avec le nucléole, l'importance de protéines nucléolaires et quelles fonctions du nucléole sont importantes pour l'infection. Finalement, ces expériences ont mis en lumière les fonctions multiples de VP1 et permettront une meilleure compréhension de ses rôles dans l'infection.

**COMMUNICATIONS
SCIENTIFIQUES**

2011

Présentation orale lors du congrès étudiant Armand-Frappier 2011
(17 au 19 novembre 2011 - L'estérel (Québec))
**LA PROTÉINE VP1 DU PARVOVIRUS PORCIN : MINORITAIRE,
MAIS PLUSIEURS FONCTIONS ESSENTIELLES**
M. Boisvert, V. Bouchard-Lévesque et P. Tijssen

Résumé :

Le parvovirus porcin (PPV) cause des problèmes de reproduction chez les porcs. À ce jour, plusieurs aspects de sa réplication demeurent peu connus. Ce petit virus possède un génome d'ADN simple brin de seulement 5kb, recouvert d'une capsidie icosaédrique. Cette capsidie est composée de 60 copies des protéines VP1 et VP2, dans un ratio 1:10. La séquence de la protéine VP2 est entièrement comprise dans la séquence de la protéine VP1 qui contient en plus une partie unique (VP1up) de 150 acides aminés. VP1up est située à l'intérieur de la capsidie lors de l'assemblage du virus, et sera externalisée lors des premières étapes de l'infection. Ce changement conformationnel lors du passage dans la voie endosomale permet l'exposition du motif de phospholipase qui est essentielle à l'infection. Cette enzyme permet l'évasion du virus de la voie endosomale. VP1up contient aussi plusieurs régions riches en acides aminés basiques (BR) pouvant correspondre à des motifs de localisation nucléaires (NLS) qui pourraient être importants pour transporter le virus au noyau lors de l'infection précoce. Ces régions ont été mutées individuellement et en combinaisons afin d'identifier lesquelles possèdent une activité NLS fonctionnelle. Nous avons ainsi déterminé que deux des BRs possèdent une importante activité NLS. De plus, ces BRs sont importants dans le cadre de l'infection puisque la mutation de ces régions dans le clone infectieux le rend incapable de compléter le cycle de réplication virale. De plus, nous avons observé que la protéine VP1up de type sauvage se localise naturellement au noyau, mais en plus, elle se concentre au nucléole. Nous avons démontré que VP1up interagit avec la protéine nucléolaire nucléophosmin et que VP1up peut relocaliser celle-ci au cytoplasme. Le rôle du nucléole dans le cycle de réplication virale pourrait se situer au niveau du contrôle du cycle cellulaire, d'une inhibition des réponses de stress, ou participer à des événements tardifs de la réplication tels que l'assemblage des nouvelles particules virales. La signification de l'interaction entre le PPV et le nucléole dans le cadre de l'infection virale est un aspect de sa

réplication très intéressante puisque le PPV est le premier parvovirus autonome pour qui une interaction avec le nucléole est démontrée.

Contribution de Maude Boisvert aux résultats en lien avec ce mémoire :

Évaluation de l'activité de transport nucléaire de la BR2 de VP1up, Analyse de l'infectivité et de la production virale pour les mutants BR2/BR3 et BR4/BR5 du PPV, Observation de l'interaction de VP1up avec la protéine nucléolaire nucléophosmine/B23 et évaluation de l'implication de ses BRs.

2010

Présentation d'une affiche lors du XIII congrès sur le Parvovirus (20 au 24 juin 2010 - Helsinki (Finlande))

MULTIPLE PATHWAYS INVOLVED IN PORCINE PARVOVIRUS CELLULAR ENTRY AND TRAFFICKING TOWARDS THE NUCLEUS

M. Boisvert, V. Bouchard-Lévesque, S. Fernandes and P. Tijssen

Résumé :

Porcine parvovirus (PPV) is a major cause of reproduction failure in swine. Details regarding its replication cycle and interaction with cells are still poorly understood. Recently published work concerning PPV cellular entry and transport towards the nucleus showed that PPV can use additional pathways from those already demonstrated in the literature for other related parvovirus. The cellular machineries hijacked by the virus were revealed using specific chemical inhibitors prior to cell infection. Viral replication was then compared in treated and normal cells. Using this method, we were able to demonstrate that the virus used classical receptor-mediated endocytosis through clathrin-coated pits, but a large amount of virus, mostly arranged in aggregates was shown to preferably use macropinocytosis. This is relevant since most experiments using purified monodispersed virus suspensions on cells may not reflect the reality of naturally occurring infections in the host. Regardless the entry pathway used the virus absolutely required prior binding to cell surface proteins containing sialic acid groups. Irrespective of the initial entry pathway, further proceeding in the cell included the endosomes acidification and transit through the late endosomes. Transport of the virion was achieved both by the microtubule and actin networks, but a pulse inhibition showed

that the latter network was important later in infection, perhaps for transport of the newly synthesized proteins or exocytosis of infectious virus. Capsid proteins were also shown to be ubiquitinated in the first hours of the infection, and the catalytic activity of the proteasome was essential. This process might help uncoating and genome delivery to the nucleus. Mutagenesis of the surface exposed lysine residues will help to understand the functional meaning of ubiquitination. Taken together, these results provided new insights on the first steps of PPV infection, including the use of alternative entry pathways, unique among this viral family.

NUCLEAR AND NUCLEOLAR TRANSPORT ACTIVITIES OF THE UNIQUE PART OF PORCINE PARVOVIRUS VP1 CAPSID PROTEIN AND ITS ROLES IN INFECTIVITY

V. Bouchard-Lévesque, M. Boisvert, S. Fernandes and P. Tijssen

Résumé :

The capsid of Porcine parvovirus (PPV) is formed of an arrangement of VP1 and VP2 proteins. The VP1 protein sequence is identical to that of VP2 with the addition of a unique part of 150 residues (VP1up). This region is essential for the infectivity, notably because of the presence of a viral phospholipase A₂ motif (pvPLA₂) acting in the first steps of viral infection. In addition, VP1up contains 4 basic regions potentially corresponding to nuclear localization signals (NLS), termed BR1 (aa 3-9), BR2 (aa 110-116), BR3 (aa 120-130) and BR4 (aa 137-141), that can also contribute to its importance in infectivity. These regions may be crucial for nuclear translocation of the capsid in early infection and to promote the translocation of the VP1/VP2 trimers later in the infection. Recombinant proteins containing VP1up fused to the mCherry fluorescent protein were generated in an expression vector. Site-directed mutagenesis in the BRs and immunofluorescence experiments demonstrated that BR1 and BR3 were important functional NLSs. Moreover, BR2 and BR4 were also weak NLSs. VP1up carrying BR mutations are currently being inserted in the PPV infectious clone to better understand the implication of the NLSs in the infection cycle. Furthermore, in these experiments, VP1up naturally localized to nucleoli and some BRs were important for VP1up nucleolar localization. This subnuclear compartment and nucleolar proteins were shown to have roles in cell cycle regulation,

ubiquitination and stress responses. Viral interaction with the nucleoli could be important for replication of the virus, through prolongation of the S phase, which is crucial for viral replication. We have also shown that ubiquitination of viral proteins occurs in the early steps of the infection. Inhibition of cellular stress responses may enhance the infection by preventing apoptosis or host-cell shutdown of protein synthesis. Finally, in immunofluorescence experiments, we observed that PPV infection increased B23 nucleophosmin staining in the nucleolus. The exact roles of the interactions between the nucleolus and PPV proteins are currently being investigated. In conclusion, these experiments probe the multiple functions of the VP1 protein to further understand its roles for PPV infection.

2009

Présentation d'une affiche lors du congrès étudiant Armand-Frappier 2009 (5 au 7 novembre 2009 - Bromont (Québec))
 STRUCTURE ET FONCTION DE LA PARTIE UNIQUE DE LA PROTÉINE VP1 DU PARVOVIRUS PORCIN
 V. Bouchard-Lévesque, K. Gehring et P. Tijssen

Résumé :

Le parvovirus porcine (PPV) est un petit virus non enveloppé à ADN simple brin linéaire appartenant à la famille des Parvoviridae. Sa capsid est composée des protéines VP1 et VP2. Ces protéines possèdent une séquence commune, leur gène étant superposés, c'est l'épissage alternatif qui détermine laquelle d'entre elles sera synthétisée. La plupart du temps, le codon d'initiation de VP1, situé dans un petit intron, est enlevé et par le fait même, c'est VP2 qui est produite. Bien que la capsid du PPV puisse entièrement être formée de VP2, une particule virale possédant une telle capsid est incapable de compléter son cycle de réplication. La partie unique de VP1 (VP1up), située en N-terminale de la protéine et encodée par la région du génome n'étant pas partagée avec VP2, est donc cruciale pour l'infectivité. L'importance de VP1up dans l'infectivité pourrait potentiellement être expliquée par le fait qu'elle possède une activité phospholipase A₂ sécrétée (sPLA₂) au niveau d'un domaine extrêmement conservé parmi presque tous les Parvoviridae. En effet, la PLA₂ virale (pvPLA₂) assure une fonction capitale dans les étapes précoces du cycle viral, ce qui lui confère une importance primordiale dans l'infection. Plus précisément, notre laboratoire a démontré que son rôle se situe ultérieurement à

l'attachement à la cellule, à l'entrée dans la cellule et à l'entrée dans la voie endocytique mais préalablement aux processus nucléaires. Étant donné l'importance de la pvPLA₂ dans l'infectivité et les nombreuses différences la distinguant des sPLA₂, nous procédons à sa caractérisation. Ainsi, nous avons optimisé l'expression et la purification de fragments de VP1. Présentement, des essais de résonance magnétique nucléaire (RMN) sont en route afin de résoudre la structure tridimensionnelle de la région N-terminale de VP1. Aussi, des mutations ont été introduites dans le site présumé d'attachement aux membranes de la pvPLA₂ et de tels mutants seront également générés pour le site actif. Ces mutants seront soumis à des essais enzymatiques, permettant alors l'identification d'acides aminés critiques de la pvPLA₂. De plus, nous allons étudier le rôle de la pvPLA₂ dans le contexte de l'infection afin de déterminer si cette enzyme est impliquée dans la sortie de la voie endosomale et/ou dans l'entrée au noyau. Finalement, nous utiliserons les informations obtenues lors de la caractérisation dans le but d'obtenir des inhibiteurs de l'enzyme virale par criblage à haut débit (HTS), ouvrant ainsi la voie au développement d'un inhibiteur spécifique en tant que nouvelle classe de drogue antivirale, ce qui constituerait un avancement majeur dans la lutte contre cette infection.

- 2008 Présentation d'une affiche lors du XII congrès sur le Parvovirus (1 au 5 juin 2008 - Córdoba (Espagne))
 EARLY STEPS OF PORCINE PARVOVIRUS INFECTION
 M. Boisvert, V. Bouchard-Lévesque, S. Fernandes and P. Tijssen

Résumé :

Mechanisms implicated in the early events of the porcine parvovirus infection are still poorly understood. First, the mechanisms of host cell entry were investigated. Different inhibitors of macropinocytosis (amiloride), clathrin coated pits formation (chlorpromazine) and caveolae assembly (nystatin) were used separately to inhibit these entry pathways. The results show that the virus may enter via receptor mediated endocytosis, but a large amount of virus can enter by macropinocytosis. Once inside the cell, the virus can navigate toward the nucleus in part through endosomal trafficking, but must escape the vesicles to interact with the nuclear membrane. Acidification of the endosomes is essential since treatment of the cells with bafilomycin A1 completely abolished the infection.

Furthermore, transport along the microtubule network was shown to be necessary but not exclusive for the virus to reach the nucleus. Indeed, treatment of the cells with nocodazole, which disrupts the network, resulted in limited viral infectivity. However replication was not totally inhibited, suggesting others means of transport such as the actin microfilaments are also used. Additionally, the viral PLA₂ was previously shown to be essential early in infection yet its mechanism has remained elusive. Although attempts at crystallization of VP1_{up} have been unsuccessful thus far, we are now attempting to determine its structure by NMR spectroscopy. This will provide important clues to its role in intracellular trafficking and give an opportunity to screen for compounds interacting specifically with the PLA₂ active site and inhibit its activity. In conclusion, these results have revealed some mechanisms for the virus to reach the nucleus. Further work will also address the form in which the virus can enter the nucleus, either as a complete or somewhat modified particle, and how the viral genome is delivered into the nucleus.

2007

Présentation d'une affiche lors du congrès étudiant Armand-Frappier 2007 (8 au 10 novembre 2007 - Orford (Québec))

IMPORTANCE DES SIGNAUX DE LOCALISATION NUCLÉAIRE DE LA PROTÉINE VP1 DU PARVOVIRUS PORCIN AU NIVEAU DE L'INFECTIVITÉ

V. Bouchard-Lévesque, S. Fernandes et P. Tijssen

Résumé :

Le parvovirus porcin (PPV) est un virus non-enveloppé ayant une capsidie constituée de deux protéines structurales, VP1 et VP2. Celles-ci possèdent une séquence commune, leur gène étant superposés, c'est l'épissage alternatif qui détermine laquelle de ces protéines sera synthétisée. La plupart du temps, le codon d'initiation de VP1 qui se trouve dans un petit intron est enlevé et par le fait même, c'est VP2 qui est synthétisée, son codon d'initiation étant conservé. Bien que la capsidie puisse être entièrement formée par la protéine VP2, une telle capsidie ne peut donner naissance à une particule virale infectieuse. Ceci démontre l'importance de VP1 au niveau de l'infectivité. Celle-ci joue probablement un rôle dans le transport nucléaire du virus puisqu'une particule virale ayant une capsidie composée seulement de VP2 peut être absorbée par une cellule mais ne peut être internalisée d'où l'incapacité de se

répliquer. Cette hypothèse est également validée par le fait que VP1 possède 3 séquences riches en résidus basiques pouvant correspondre à des signaux de localisation nucléaire (NLS). Celles-ci sont situées dans la partie unique de la protéine (VP1up), soit la région du génome ne codant que pour VP1 et ne sont donc pas partagée avec VP2. Ainsi, cette étude vise à déterminer le rôle de ces possibles signaux de localisation nucléaire chez la protéine VP1 du PPV au niveau de l'infectivité du virus. En effet, nous croyons que ceux-ci jouent un rôle crucial dans l'internalisation du virus et donc dans sa capacité à infecter. Afin d'éviter la toxicité due à la phospholipase A₂, les manipulations ont été effectuées à partir d'un gène codant pour la VP1up dépourvue de son activité enzymatique, soit le gène de VP1up HD. Aussi, Seule la partie N-terminale du gène de VP1 a été clonée de façon à réduire l'influence des motifs de localisation nucléaire présent dans la région commune à VP2.

BIBLIOGRAPHIE

Agbandje-McKenna, M., Llamas-Saiz, A.L., Wang, F., Tattersall, P., Rossmann, M.G., 1998. Functional implications of the structure of the murine parvovirus, minute virus of mice. *Structure* (London, England : 1993) 6, 1369-1381.

Agbandje, M., McKenna, R., Rossmann, M.G., Strassheim, M.L., Parrish, C.R., 1993. Structure determination of feline panleukopenia virus empty particles. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 16, 155-171.

Agbandje, M., Parrish*, C.R., Rossmann, M.G., 1995. The structure of parvoviruses. *Seminars in Virology* 6, 299-309.

Arella, M.S., Garzon, S., Bergeron, J., Tijssen, P., 1990. Physicochemical properties, production, and purification of parvoviruses, in: Tijssen, P. (Ed.), *Handbook of parvoviruses*. CRC Press, Boca raton FL, pp. 11-30.

Astell, C.R., Mol, C.D., Anderson, W.F., 1987. Structural and Functional Homology of Parvovirus and Papovavirus Polypeptides. *J Gen Virol* 68, 885-893.

Ball-Goodrich, L.J., Tattersall, P., 1992. Two amino acid substitutions within the capsid are coordinately required for acquisition of fibrotropism by the lymphotropic strain of minute virus of mice. *J Virol* 66, 3415-3423.

Banerjee, R., Weidman, M.K., Navarro, S., Comai, L., Dasgupta, A., 2005. Modifications of both selectivity factor and upstream binding factor contribute to poliovirus-mediated inhibition of RNA polymerase I transcription. *Journal of General Virology* 86, 2315-2322.

Barbis, D.P., Chang, S.-F., Parrish, C.R., 1992. Mutations adjacent to the dimple of the canine parvovirus capsid structure affect sialic acid binding. *Virology* 191, 301-308.

Basak, S., Turner, H., 1992. Infectious entry pathway for canine parvovirus. *Virology* 186, 368-376.

Bashir, T., Hörlein, R., Rommelaere, J., Willwand, K., 2000. Cyclin A activates the DNA polymerase δ -dependent elongation machinery in vitro: A parvovirus DNA replication model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 5522-5527.

Bashir, T., Rommelaere, J., Cziepluch, C., 2002. In vivo accumulation of cyclin A and cellular replication factors in autonomous parvovirus minute virus of mice-associated replication bodies. *J Virol* 75, 4394-4398.

Bergeron, J., Hebert, B., Tijssen, P., 1996. Genome organization of the Kresse strain of porcine parvovirus: identification of the allotropic determinant and comparison with those of NADL-2 and field isolates. *J Virol* 70, 2508-2515.

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

Bertrand, L., Pearson, A., 2008. The conserved N-terminal domain of herpes simplex virus 1 UL24 protein is sufficient to induce the spatial redistribution of nucleolin. *Journal of General Virology* 89, 1142-1151.

Bevington, J.M., Needham, P.G., Verrill, K.C., Collaco, R.F., Basrur, V., Trempe, J.P., 2007. Adeno-associated virus interactions with B23/Nucleophosmin: Identification of sub-nucleolar virion regions. *Virology* 357, 102-113.

Boisvert, M., Fernandes, S., Tijssen, P., 2010. Multiple pathways involved in porcine parvovirus cellular entry and trafficking toward the nucleus. *J Virol* 84, 7782-7792.

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

Brandenburger, A., Legendre, D., Avalosse, B., Rommelaere, J., 1990. NS-1 and NS-2 proteins may act synergistically in the cytopathogenicity of parvovirus MVMp. *Virology* 174, 576-584.

Brownstein, D.G., Smith, A.L., Johnson, E.A., Pintel, D.J., Naeger, L.K., Tattersall, P., 1992. The pathogenesis of infection with minute virus of mice depends on expression of the small nonstructural protein NS2 and on the genotype of the allotropic determinants VP1 and VP2. *J Virol* 66, 3118-3124.

Burke, J.E., Dennis, E.A., 2009. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *Journal of Lipid Research* 50, S237-S242.

Caillet-Fauquet, P., Perros, M., Brandenburger, A., Spegelaere, P., Rommelaere, J., 1990. Programmed killing of human cells by means of an inducible clone of parvoviral genes encoding non-structural proteins. *EMBO J* 9, 2989-2995.

Canaan, S., Zádori, Z., Ghomashchi, F., Bollinger, J., Sadilek, M., Moreau, M.E., Tijssen, P., Gelb, M.H., 2004. Interfacial Enzymology of Parvovirus Phospholipases A2. *Journal of Biological Chemistry* 279, 14502-14508.

Cater, J.E., Pintel, D.J., 1992. The small non-structural protein NS2 of the autonomous parvovirus minute virus of mice is required for virus growth in murine cells. *J Gen Virol* 73, 1839-1843.

Chapman, M.S., Agbandje-McKenna, M., 2006. Atomic structure of viral particles, in: Kerr, J.R., Cotmore, S.F., Bloom, M.E., Linden, M.R., Parrish, C.R. (Eds.), *Parvoviruses*. Hodder Arnold, London, U.K., pp. 107-123.

Chapman, M.S., Rossmann, M.G., 1993. Structure, Sequence, and Function Correlations among Parvoviruses. *Virology* 194, 491-508.

Chapman, M.S., Rossmann, M.G., 1996. Structural refinement of the DNA-containing capsid of canine parvovirus using RSRef, a resolution-dependent stereochemically restrained real-space refinement method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 52, 129-142.

Clemens, D.L., Wolfenbarger, J.B., Mori, S., Berry, B.D., Hayes, S.F., Bloom, M.E., 1992. Expression of Aleutian mink disease parvovirus capsid proteins by a recombinant vaccinia virus: self-assembly of capsid proteins into particles. *J Virol* 66, 3077-3085.

Cohen, S., Behzad, A.R., Carroll, J.B., Pante, N., 2006. Parvoviral nuclear import: bypassing the host nuclear-transport machinery. *J Gen Virol* 87, 3209-3213.

Cohen, S., Pante, N., 2005. Pushing the envelope: microinjection of Minute virus of mice into *Xenopus* oocytes causes damage to the nuclear envelope. *J Gen Virol* 86, 3243-3252.

Corbau, R., Salomé, N., Rommelaere, J., Nüesch, J.P.F., 1999. Phosphorylation of the Viral Nonstructural Protein NS1 during MVMP Infection of A9 Cells. *Virology* 259, 402-415.

Cotmore, S.F., D'Abramo, A.M., Carbonell, L.F., Bratton, J., Tattersall, P., 1997. The NS2 Polypeptide of Parvovirus MVM Is Required for Capsid Assembly in Murine Cells. *Virology* 231, 267-280.

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

Cotmore, S.F., Gunther, M., Tattersall, P., 1989. Evidence for a ligation step in the DNA replication of the autonomous parvovirus minute virus of mice. *J Gen Virol* 63, 1002-1006.

Cotmore, S.F., Tattersall, P., 1986. The NS-1 polypeptide of the autonomous parvovirus MVM is a nuclear phosphoprotein. *Virus Research* 4, 243-250.

Cotmore, S.F., Tattersall, P., 1987. The Autonomously Replicating Parvoviruses of Vertebrates, in: Karl Maramorosch, F.A.M., Aaron, J.S. (Eds.), *Advances in Virus Research*. Academic Press, pp. 91-174.

Cotmore, S.F., Tattersall, P., 1990. Alternate splicing in a parvoviral nonstructural gene links a common amino-terminal sequence to downstream domains which confer radically different localization and turnover characteristics. *Virology* 177, 477-487.

Cotmore, S.F., Tattersall, P., 1995. DNA replication in the autonomous parvoviruses. *Seminars in Virology* 6, 271-281.

Cotmore, S.F., Tattersall, P., 2005. Genome packaging sense is controlled by the efficiency of the nick site in the right-end replication origin of parvoviruses minute virus of mice and Lull. *J Virol* 79, 2287-2300.

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

Cutlip, R.C., Mengeling, W.L., 1975. Pathogenesis of in utero infection: experimental infection of eight- and ten-week-old porcine fetuses with porcine parvovirus. *Am J Vet Res* 36, 1751-1754.

Deleu, L., Pujol, A., Faisst, S., Rommelaere, J., 1999. Activation of promoter P4 of the autonomous parvovirus minute virus of mice at early S phase is required for productive infection. *J Virol* 73, 3877-3885.

Dennis, E.A., 1994. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *The Journal of biological chemistry* 269, 13057-13060.

Dennis, E.A., 1997. The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes. *Trends in Biochemical Sciences* 22, 1-2.

Dove, B.K., You, J.-H., Reed, M.L., Emmett, S.R., Brooks, G., Hiscox, J.A., 2006. Changes in nucleolar morphology and proteins during infection with the coronavirus infectious bronchitis virus. *Cellular Microbiology* 8, 1147-1157.

Eichwald, V., Daeffler, L., Klein, M., Rommelaere, J., Salome, N., 2002. The NS2 proteins of parvovirus minute virus of mice are required for efficient nuclear egress of progeny virions in mouse cells. *J Virol* 76, 10307-10319.

Emmott, E., Hiscox, J.A., 2009. Nucleolar targeting: the hub of the matter. *EMBO Rep* 10, 231-238.

Engelsma, D., Valle, N., Fish, A., Salome, N., Almendral, J.M., Fornerod, M., 2008. A Supraphysiological Nuclear Export Signal Is Required for Parvovirus Nuclear Export. *Mol. Biol. Cell* 19, 2544-2552.

Farr, G.A., Cotmore, S.F., Tattersall, P., 2006. VP2 cleavage and the leucine ring at the base of the fivefold cylinder control pH-dependent externalization of both the VP1 N terminus and the genome of minute virus of mice. *J Virol* 80, 161-171.

Farr, G.A., Tattersall, P., 2004. A conserved leucine that constricts the pore through the capsid fivefold cylinder plays a central role in parvoviral infection. *Virology* 323, 243-256.

Farr, G.A., Zhang, L.-g., Tattersall, P., 2005. Parvoviral virions deploy a capsid-tethered lipolytic enzyme to breach the endosomal membrane during cell entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 17148-17153.

Faustino, R.S., Nelson, T.J., Terzic, A., Perez-Terzic, C., 2007. Nuclear Transport: Target for Therapy. *Clin Pharmacol Ther* 81, 880-886.

Gardiner, E.M., Tattersall, P., 1988. Mapping of the fibrotropic and lymphotropic host range determinants of the parvovirus minute virus of mice. *J Virol* 62, 2605-2613.

Hanson, N.D., Rhode, S.L., 3rd 1991. Parvovirus NS1 stimulates P4 expression by interaction with the terminal repeats and through DNA amplification. *J Virol* 65, 4325-4333.

Hernando, E., Llamas-Saiz, A.L., Foces-Foces, C., McKenna, R., Portman, I., Agbandje-McKenna, M., Almendral, J.M., 2000. Biochemical and Physical Characterization of Parvovirus Minute Virus of Mice Virus-like Particles. *Virology* 267, 299-309.

Hiscox, J.A., 2007. RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus. *Nat Rev Micro* 5, 119-127.

Jindal, K., H., Yong, B., C., Wilson, M., G., Tma, P., Astell, R., C., 1994. Mutations in the NTP-binding motif of minute virus of mice (MVM) NS-1 protein uncouple ATPase and DNA helicase functions. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Bethesda, MD, ETATS-UNIS.

Johnson, R.H., Collings, D.F., 1969. Experimental infection of piglets and pregnant gilts with a parvovirus. *Vet Rec* 85, 446-447.

Johnson, R.H., Collings, D.F., 1971. Transplacental infection of piglets with a porcine parvovirus. *Res Vet Sci* 12, 570-572.

Jongeneel, C.V., Sahli, R., McMaster, G.K., Hirt, B., 1986. A precise map of splice junctions in the mRNAs of minute virus of mice, an autonomous parvovirus. *J Virol* 59, 564-573.

Joo, H.S., Donaldson-Wood, C.R., Johnson, R.H., 1976. Observations on the pathogenesis of porcine parvovirus infection. *Arch Virol* 51, 123-129.

Kim, J., Chae, C., 2004. Concurrent presence of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in retrospective cases of exudative epidermitis in pigs. *The Veterinary Journal* 167, 104-106.

Kontou, M., Govindasamy, L., Nam, H.J., Bryant, N., Llamas-Saiz, A.L., Foces-Foces, C., Hernando, E., Rubio, M.P., McKenna, R., Almendral, J.M., Agbandje-McKenna, M., 2005. Structural determinants of tissue tropism and in vivo pathogenicity for the parvovirus minute virus of mice. *J Virol* 79, 10931-10943.

Kozak, M., 1985. Adherence to the first-AUG rule when a second AUG codon follows closely upon the first. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7134.

Kramer, G., Boehringer, D., Ban, N., Bukau, B., 2009. The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins. *Nat Struct Mol Biol* 16, 589-597.

Kresse, J.I., Taylor, W.D., Stewart, W.W., Eernisse, K.A., 1985. Parvovirus infection in pigs with necrotic and vesicle-like lesions. *Veterinary Microbiology* 10, 525-531.

Labieniec-Pintel, L., Pintel, D., 1986. The minute virus of mice P39 transcription unit can encode both capsid proteins. *J Virol* 57, 1163-1167.

Lambeau, G., Ancian, P., Nicolas, J.-P., Beiboer, S.H.W., Moinier, D., Verheij, H., Lazdunski, M., 1995. Structural Elements of Secretory Phospholipases A2

Involved in the Binding to M-type Receptors. *Journal of Biological Chemistry* 270, 5534-5540.

Lebovitz, R.M., Roeder, R.G., 1986. Parvovirus H-1 expression: mapping of the abundant cytoplasmic transcripts and identification of promoter sites and overlapping transcription units. *J Virol* 58, 271-280.

Legrand, C., Rommelaere, J., Caillet-Fauquet, P., 1993. MVM(p) NS-2 Protein Expression Is Required with NS-1 for Maximal Cytotoxicity in Human Transformed Cells. *Virology* 195, 149-155.

Li, X., Rhode, S.L., 3rd, 1991. Nonstructural protein NS2 of parvovirus H-1 is required for efficient viral protein synthesis and virus production in rat cells *in vivo* and *in vitro*. *Virology* 184, 117-130.

Li, Y., Yu, B.-Z., Zhu, H., Jain, M.K., Tsai, M.-D., 1994. Phospholipase A2 Engineering. Structural and Functional Roles of the Highly Conserved Active Site Residue Aspartate-49. *Biochemistry* 33, 14714-14722.

Llamas-Saiz, A.L., Agbandje-Mckenna, M., Parker, J.S.L., Wahid, A.T.M., Parrish, C.R., Rossmann, M.G., 1996. Structural Analysis of a Mutation in Canine Parvovirus Which Controls Antigenicity and Host Range. *Virology* 225, 65-71.

Lohrum, M.A.E., Ashcroft, M., Kubbutat, M.H.G., Vousden, K.H., 2000. Identification of a cryptic nucleolar-localization signal in MDM2. *Nat Cell Biol* 2, 179-181.

Lombardo, E., Ramirez, J.C., Agbandje-McKenna, M., Almendral, J.M., 2000. A beta-stranded motif drives capsid protein oligomers of the parvovirus minute virus of mice into the nucleus for viral assembly. *J Virol* 74, 3804-3814.

Lombardo, E., Ramirez, J.C., Garcia, J., Almendral, J.M., 2002. Complementary roles of multiple nuclear targeting signals in the capsid proteins of the parvovirus minute virus of mice during assembly and onset of infection. *J Virol* 76, 7049-7059.

Lopez-Bueno, A., Rubio, M.P., Bryant, N., McKenna, R., Agbandje-McKenna, M., Almendral, J.M., 2006. Host-selected amino acid changes at the sialic acid binding pocket of the parvovirus capsid modulate cell binding affinity and determine virulence. *J Virol* 80, 1563-1573.

Lopez de Turiso, J.A., Cortes, E., Martinez, C., Ruiz de Ybanez, R., Simarro, I., Vela, C., Casal, I., 1992. Recombinant vaccine for canine parvovirus in dogs. *J Virol* 66, 2748-2753.

Lymberopoulos, M.H., Pearson, A., 2007. Involvement of UL24 in herpes-simplex-virus-1-induced dispersal of nucleolin. *Virology* 363, 397-409.

Mani, B., Baltzer, C., Valle, N., Almendral, J.M., Kempf, C., Ros, C., 2006. Low pH-dependent endosomal processing of the incoming parvovirus minute virus of mice virion leads to externalization of the VP1 N-terminal sequence (N-VP1), N-VP2 cleavage, and uncoating of the full-length genome. *J Virol* 80, 1015-1024.

Martínez, C., Dalsgaard, K., López de Turiso, J., Cortés, E., Vela, C., Casal, J., 1992. Production of porcine parvovirus empty capsids with high immunogenic activity. *Vaccine* 10, 684-690.

Mengeling, W.L., 1972. Porcine parvovirus: properties and prevalence of a strain isolated in the United States. *Am J Vet Res* 33, 2239-2248.

Mengeling, W.L., Cutlip, R.C., 1975. Pathogenesis of in utero infection: experimental infection of five-week-old porcine fetuses with porcine parvovirus. *Am J Vet Res* 36, 1173-1177.

Mengeling, W.L., Cutlip, R.C., 1976. Reproductive disease experimentally induced by exposing pregnant gilts to porcine parvovirus. *Am J Vet Res* 37, 1393-1400.

Mengeling, W.L., Pejsak, Z., Paul, P.S., 1984. Biological assay of attenuated strain NADL-2 and virulent strain NADL-8 of porcine parvovirus. *Am J Vet Res* 45, 2403-2407.

Mengeling, W.L., Ridpath, J.F., Vorwald, A.C., 1988. Size and antigenic comparisons among the structural proteins of selected autonomous parvoviruses. *J. gen. Virol* 69, 825-837.

Michael, W.M., Eder, P.S., Dreyfuss, G., 1997. The K nuclear shuttling domain: a novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein. *EMBO J* 16, 3587-3598.

Miller, C.L., Pintel, D.J., 2001. The NS2 Protein Generated by the Parvovirus Minute Virus of Mice Is Degraded by the Proteasome in a Manner Independent of Ubiquitin Chain Elongation or Activation. *Virology* 285, 346-355.

Molitor, T.W., Joo, H.S., 1990. Clinical and pathological features of porcine parvovirus-related disease and its diagnosis, in: Tijssen, P. (Ed.), *Handbook of Parvoviruses*. CRC press, Boca Raton FL, pp. 135-149.

Molitor, T.W., Joo, H.S., Collett, M.S., 1983. Porcine parvovirus: virus purification and structural and antigenic properties of virion polypeptides. *J Virol* 45, 842-854.

Molitor, T.W., Joo, H.S., Collett, M.S., 1985. Identification and characterization of a porcine parvovirus nonstructural polypeptide. *J Virol* 55, 554-559.

Morgan, W.R., Ward, D.C., 1986. Three splicing patterns are used to excise the small intron common to all minute virus of mice RNAs. *J Virol* 60, 1170-1174.

Naeger, L.K., Cater, J., Pintel, D.J., 1990. The small nonstructural protein (NS2) of the parvovirus minute virus of mice is required for efficient DNA replication and infectious virus production in a cell-type-specific manner. *J Virol* 64, 6166-6175.

Naeger, L.K., Salome, N., Pintel, D.J., 1993. NS2 is required for efficient translation of viral mRNA in minute virus of mice-infected murine cells. *J Virol* 67, 1034-1043.

Nielsen, J., Rønsholt, L., Sørensen, K.J., 1991. Experimental in utero infection of pig fetuses with porcine parvovirus (PPV). *Veterinary Microbiology* 28, 1-11.

Nuesch, J.P., Corbau, R., Tattersall, P., Rommelaere, J., 1998. Biochemical activities of minute virus of mice nonstructural protein NS1 are modulated in vitro by the phosphorylation state of the polypeptide. *J Virol* 72, 8002-8012.

Nuesch, J.P., Dettwiler, S., Corbau, R., Rommelaere, J., 1998. Replicative functions of minute virus of mice NS1 protein are regulated in vitro by phosphorylation through protein kinase C. *J Virol* 72, 9966-9977.

Nüesch, J.P.F., Cotmore, S.F., Tattersall, P., 1995. Sequence Motifs in the Replicator Protein of Parvovirus MVM Essential for Nicking and Covalent Attachment to the Viral Origin: Identification of the Linking Tyrosine. *Virology* 209, 122-135.

Nüesch, J.P.F., Tattersall, P., 1993. Nuclear Targeting of the Parvoviral Replicator Molecule NS1: Evidence for Self-Association Prior to Nuclear Transport. *Virology* 196, 637-651.

Oraveerakul, K., Choi, C.S., Molitor, T.W., 1992. Restriction of porcine parvovirus replication in nonpermissive cells. American Society for Microbiology, Washington, DC, ETATS-UNIS.

Oraveerakul, K., Choi, C.S., Molitor, T.W., 1993. Tissue tropisms of porcine parvovirus in swine. *Archives of Virology* 130, 377-389.

Otsuka, M., Kato, N., Lan, K.-H., Yoshida, H., Kato, J., Goto, T., Shiratori, Y., Omata, M., 2000. Hepatitis C Virus Core Protein Enhances p53 Function through Augmentation of DNA Binding Affinity and Transcriptional Ability. *Journal of Biological Chemistry* 275, 34122-34130.

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

Paul, P., Mengeling, W., Brown, T.J., 1980. Effect of vaccinal and passive immunity on experimental infection of pigs with porcine parvovirus. *Am J Vet Res.* 41, 1368-1371.

Pintel, D., Dadachanji, D., Astell, C.R., Ward, D.C., 1983. The genome of minute virus of mice, an autonomous parvovirus, encodes two overlapping transcription units. *Nucleic Acids Research* 11, 1019-1038.

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

Pritchard, C., Patton, J.T., Bates, R.C., Stout, E.R., 1978. Replication of nondefective parvoviruses: lack of a virion-associated DNA polymerase. *J Virol* 28, 20-27.

Pujol, A., Deleu, L., Nuesch, J.P., Cziepluch, C., Jauniaux, J.C., Rommelaere, J., 1997. Inhibition of parvovirus minute virus of mice replication by a peptide involved in the oligomerization of nonstructural protein NS1. *J Virol* 71, 7393-7403.

Qiu, J., Brown, K.E., 1999. A 110-kDa Nuclear Shuttle Protein, Nucleolin, Specifically Binds to Adeno-Associated Virus Type 2 (AAV-2) Capsid. *Virology* 257, 373-382.

Realdon, S., Gerotto, M., Dal Pero, F., Marin, O., Granato, A., Basso, G., Muraca, M., Alberti, A., 2004. Proapoptotic effect of hepatitis C virus CORE protein in transiently transfected cells is enhanced by nuclear localization and is dependent on PKR activation. *Journal of hepatology* 40, 77-85.

Reed, A.P., Jones, E.V., Miller, T.J., 1988. Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. *J Virol* 62, 266-276.

Renetseder, R., Brunie, S., Dijkstra, B.W., Drenth, J., Sigler, P.B., 1985. A comparison of the crystal structures of phospholipase A2 from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. *Journal of Biological Chemistry* 260, 11627-11634.

Reynolds, L.J., Hughes, L.L., Dennis, E.A., 1992. Analysis of human synovial fluid phospholipase A2 on short chain phosphatidylcholine-mixed micelles: Development of a spectrophotometric assay suitable for a microtiterplate reader. *Analytical Biochemistry* 204, 190-197.

Rhode, S.L., 3rd, 1985. Trans-activation of parvovirus P38 promoter by the 76K noncapsid protein. *J Virol* 55, 886-889.

Rhode, S.L., Richard, S.M., 1977. Characterization of the trans-activation-responsive element of the parvovirus H-1 P38 promoter. *J Virol* 61, 2807-2815.

Rhode, S.L., Paradiso, P.R., 1989. Parvovirus replication in normal and transformed human cells correlates with the nuclear translocation of the early protein NS1. *J Virol* 63, 349-355.

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

Riolobos, L., Reguera, J., Mateu, M.G., Almendral, J.M., 2006. Nuclear Transport of Trimeric Assembly Intermediates Exerts a Morphogenetic Control on the Icosahedral Parvovirus Capsid. *Journal of Molecular Biology* 357, 1026-1038.

Ros, C., Baltzer, C., Mani, B., Kempf, C., 2006. Parvovirus uncoating in vitro reveals a mechanism of DNA release without capsid disassembly and striking differences in encapsidated DNA stability. *Virology* 345, 137-147.

Saliki, J.T., Mizak, B., Flore, H.P., Gettig, R.R., Burand, J.P., Carmichael, L.E., Wood, H.A., Parrish, C.R., 1992. Canine parvovirus empty capsids produced by expression in a baculovirus vector: use in analysis of viral properties and immunization of dogs. *J Gen Virol* 73, 369-374.

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

Sekar, K., Yu, B.-Z., Rogers, J., Lutton, J., Liu, X., Chen, X., Tsai, M.-D., Jain, M.K., Sundaralingam, M., 1997. Phospholipase A2 Engineering. Structural and Functional Roles of the Highly Conserved Active Site Residue Aspartate-99†. *Biochemistry* 36, 3104-3114.

Siegl, G., Bates, R.C., Berns, K.I., Carter, B.J., Kelly, D.C., Kurstak, E., Tattersall, P., 1985. Characteristics and Taxonomy of Parvoviridae. *Intervirology* 23, 61-73.

Siegl, G., Gautschi, M., 1976. Multiplication of parvovirus Lull in a synchronized culture system. III. Replication of viral DNA. *J Virol* 17, 841-853.

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

Simpson, A.A., Hébert, B., Sullivan, G.M., Parrish, C.R., Zádori, Z., Tijssen, P., Rossmann, M.G., 2002. The structure of porcine parvovirus: comparison with related viruses. *Journal of Molecular Biology* 315, 1189-1198.

Sorokin, A., Kim, E., Ovchinnikov, L., 2007. Nucleocytoplasmic transport of proteins. *Biochemistry (Moscow)* 72, 1439-1457.

Suikkanen, S., Antila, M., Jaatinen, A., Vihinen-Ranta, M., Vuento, M., 2003. Release of canine parvovirus from endocytic vesicles. *Virology* 316, 267-280.

Szelei, J., Liu, K., Li, Y., Fernandes, S., Tijssen, P., 2010. Parvovirus 4-like virus in blood products. *Emerg Infect Dis* 16, 561-564.

Tattersall, P., 1972. Replication of the parvovirus MVM. I. Dependence of virus multiplication and plaque formation on cell growth. *J Virol* 10, 586-590.

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

Tattersall, P., Crawford, L.V., Shatkin, A.J., 1973. Replication of the parvovirus MVM. II. Isolation and characterization of intermediates in the replication of the viral deoxyribonucleic acid. *J Virol* 12, 1446-1456.

Tattersall, P., Shatkin, A.J., Ward, D.C., 1977. Sequence homology between the structural polypeptides of minute virus of mice. *Journal of Molecular Biology* 111, 375-394.

Tattersall, P., Ward, D.C., 1976. Rolling hairpin model for replication of parvovirus and linear chromosomal DNA. *Nature* 263, 106-109.

Tijssen, P., 1999. Molecular and structural basis of the evolution of parvovirus tropism. *Acta Veterinaria Hungarica* 47, 379-394.

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

Tischfield, J.A., 1997. A Reassessment of the Low Molecular Weight Phospholipase A2 Gene Family in Mammals. *Journal of Biological Chemistry* 272, 17247-17250.

Tresnan, D.B., Southard, L., Weichert, W., Sgro, J.-Y., Parrish, C.R., 1995. Analysis of the Cell and Erythrocyte Binding Activities of the Dimple and Canyon Regions of the Canine Parvovirus Capsid. *Virology* 211, 123-132.

Truyen, U., Agbandje, M., Parrish, C.R., 1994. Characterization of the Feline Host Range and a Specific Epitope of Feline Panleukopenia Virus. *Virology* 200, 494-503.

Truyen, U., Schelp, C., Löchelt, M., Kaaden, O.R., 1993. The Monomer Covalently Closed Linear Replicative Form DNA of Aleutian Disease Parvovirus is Infectious After Transfection into Permissive Cells. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 40, 66-72.

Tsao, J., Chapman, M., Agbandje, M., Keller, W., Smith, K., Wu, H., Luo, M., Smith, T., Rossmann, M., Compans, R., et al., 1991. The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science* 251, 1456-1464.

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

Tseng, A., Inglis, A.S., Scott, K.F., 1996. Native Peptide Inhibition. *Journal of Biological Chemistry* 271, 23992-23998.

Tullis, G.E., Burger, L.R., Pintel, D.J., 1993. The minor capsid protein VP1 of the autonomous parvovirus minute virus of mice is dispensable for encapsidation of progeny single-stranded DNA but is required for infectivity. *J Virol* 67, 131-141.

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

Vihinen-Ranta, M., Kakkola, L., Kalela, A., Vilja, P., Vuento, M., 1997. Characterization of a Nuclear Localization Signal of Canine Parvovirus Capsid Proteins. *European Journal of Biochemistry* 250, 389-394.

Vihinen-Ranta, M., Kalela, A., Makinen, P., Kakkola, L., Marjomaki, V., Vuento, M., 1998. Intracellular route of canine parvovirus entry. *J Virol* 72, 802-806.

Vihinen-Ranta, M., Wang, D., Weichert, W.S., Parrish, C.R., 2002. The VP1 N-terminal sequence of canine parvovirus affects nuclear transport of capsids and efficient cell infection. *J Virol* 76, 1884-1891.

Vihinen-Ranta, M., Yuan, W., Parrish, C.R., 2000. Cytoplasmic trafficking of the canine parvovirus capsid and its role in infection and nuclear transport. *J Virol* 74, 4853-4859.

Voet, D., Voet, J.G., 2005. *Métabolisme des lipides*, Biochimie 2^e édition. Boeck et Larcier s.a., Bruxelles, Belgique, pp. 910-912.

Weichert, W.S., Parker, J.S.L., Wahid, A.T.M., Chang, S.-F., Meier, E., Parrish, C.R., 1998. Assaying for Structural Variation in the Parvovirus Capsid and Its Role in Infection. *Virology* 250, 106-117.

Whitaker, H., Neu, S., Pace, L., 1990. Parvovirus infection in pigs with exudative skin disease. *J Vet Diagn Invest* 2, 244-246.

Wilhelm, S., Zimmermann, P., Selbitz, H.J., Truyen, U., 2006. Real-time PCR protocol for the detection of porcine parvovirus in field samples. *Journal of Virological Methods* 134, 257-260.

Wilson, G.M., Jindal, H.K., Yeung, D.E., Chen, W., Astell, C.R., 1991. Expression of minute virus of mice major nonstructural protein in insect cells: Purification and identification of ATPase and helicase activities. *Virology* 185, 90-98.

Wistuba, A., Kern, A., Weger, S., Grimm, D., Kleinschmidt, J., 1997. Subcellular compartmentalization of adeno-associated virus type 2 assembly. *J. Virol.* 71, 1341-1352.

Wrathall, A., 1988. Field trials of an inactivated, oil-emulsion porcine parvovirus vaccine in British pig herds. *Veterinary Record* 122, 411-418.

Wu, H., Keller, W., Rossmann, M.G., 1993. Determination and refinement of the canine parvovirus empty-capsid structure. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49, 572-579.

Wu, H., Rossmann, M.G., 1993. The Canine Parvovirus Empty Capsid Structure. *Journal of Molecular Biology* 233, 231-244.

Xie, Q., Chapman, M.S., 1996. Canine Parvovirus Capsid Structure, Analyzed at 2.9 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology* 264, 497-520.

Yu, L., Deems, R.A., Hajdu, J., Dennis, E.A., 1990. The interaction of phospholipase A2 with phospholipid analogues and inhibitors. *Journal of Biological Chemistry* 265, 2657-2664.

Yuan, W., Parrish, C.R., 2001. Canine Parvovirus Capsid Assembly and Differences in Mammalian and Insect Cells. *Virology* 279, 546-557.

Zádori, Z., Szelei, J., Lacoste, M.-C., Li, Y., Gariépy, S., Raymond, P., Allaire, M., Nabi, I.R., Tijssen, P., 2001. A Viral Phospholipase A2 Is Required for Parvovirus Infectivity. *Developmental cell* 1, 291-302.

Zadori, Z., Szelei, J., Tijssen, P., 2005. SAT: a late NS protein of porcine parvovirus. *J Virol* 79, 13129-13138.

Zhu, H., Dupureur, C.M., Zhang, X., Tsai, M.-D., 1995. Phospholipase A2 Engineering. The Roles of Disulfide Bonds in Structure, Conformational Stability, and Catalytic Function. *Biochemistry* 34, 15307-15314.