



HAL
open science

Etude des mécanismes de maturation de la polyprotéine du virus de la maladie hémorragique du lapin (RHDV)

Pascale Joubert

► To cite this version:

Pascale Joubert. Etude des mécanismes de maturation de la polyprotéine du virus de la maladie hémorragique du lapin (RHDV). Sciences du Vivant [q-bio]. Université François Rabelais (Tours), 2000. Français. NNT: . tel-02842404

HAL Id: tel-02842404

<https://hal.inrae.fr/tel-02842404>

Submitted on 7 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**Université François Rabelais -
Tours**

Ecole Doctorale : Information
Biologique
Environnement et Santé
Année Universitaire : 1999/2000

THESE
pour obtenir le grade de
**DOCTEUR EN SCIENCES DE
L'UNIVERSITE DE TOURS**
Discipline : Sciences de la vie
Présentée et soutenue par
Pascale JOUBERT
Le 17 mai 2000

Étude des mécanismes de maturation de la polyprotéine du
virus de la maladie hémorragique du lapin (RHDV)

Directeur de thèse :
Dr. Denis RASSCHAERT

Membres du jury :

- Président : Pr. Francis Gauthier, Université de Tours
- Rapporteurs : Dr. Jean Dubuisson, CNRS de Lille
Dr. Olivier Le Gall, INRA de Bordeaux
- Examineurs : Dr. Pierre Coursaget, Université de Tours
Dr. Denis Rasschaert, INRA de Tours

INTRODUCTION	1
1. LA FAMILLE DES CALICIVIRIDAE	1
1.1.Taxonomie	1
1.1.1. L'historique de la famille	1
1.1.2. Phylogénie et classification	2
1.1.3. Le cas particulier du virus de l'hépatite E (HEV)	3
1.2.Virion et composants	4
1.3.Structure et organisation génomique	6
1.4.Le cycle viral	7
1.4.1. Les phases précoces de l'infection	7
1.4.2. Réplication du génome	8
1.4.3. Synthèse protéique et maturation	9
2. LE RHDV	12
2.1.Histoire	12
2.2.Pathologie	13
2.2.1. Tableau clinique/cytopathologie	13
2.2.2. Transmission	14
2.2.3. Variabilité génétique/pathogénicité	15
2.2.4. Vaccination	15
2.3.Le cycle viral	15
2.3.1. Le virion	15
2.3.2. Le récepteur cellulaire	16
2.3.3. Réplication virale	16
Structure et organisation génomique	16
2.3.5. Synthèse protéique et maturation	17
3. LES PROTÉASES	19
3.1.Introduction	19
3.2.Les différents types de protéase	20
3.4.Maturation de la polyprotéine des <i>Picornaviridae</i>	25
3.5.Maturation de la polyprotéine des <i>Flaviviridae</i>	28
4. CONTEXTE ET OBJECTIF DU TRAVAIL	30
MATERIELS ET METHODES	31
1. SOUCHES BACTÉRIENNES, SOUCHE VIRALE ET LIGNÉES CELLULAIRES	31
1.1.Souches bactériennes d' <i>Escherichia coli</i>	31
1.2.Cellules de rein de lapin RK13	31
1.3.Lignée cellulaire LMH	31
1.4.Virus de la vaccine T7 (vTF7-3)	31
2. ANTICORPS MONOCLONAUX ET SÉRUM POLYCLONAL	32
2.1.Anticorps monoclonal 3b5	32
2.2.Sérum polyclonal anti-3D	32
2.2.1. Préparation de l'antigène	32
2.2.2. Immunisation du lapin	32

2.3.Anticorps anti-VP60	33
3. PLASMIDES	33
4. SÉQUENCES	34
4.1.Séquence peptidique de la polyprotéine du RHDV	34
4.2.Séquences des différents oligonucléotides	35
4.3.Séquence de la construction pBPL10	38
5. TECHNIQUES GENERALES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE	39
5.1.Amplification PCR	39
5.2.Purification des inserts	40
5.3.Hybridation des oligonucléotides	40
5.4.Préparation du vecteur	40
5.5.Ligation	41
5.6.Electroporation	41
5.7.Minipréparations	41
5.8.Maxipréparations	41
6. ELABORATION DES DIFFÉRENTES CONSTRUCTIONS	41
6.1.Elaboration des constructions pBPL	41
6.1.1. La construction pBPL10	41
6.1.2. Elaboration des constructions pBPL	42
6.1.3. Elaboration des constructions pEG-3CY	42
6.2.Elaboration des constructions pQ	42
6.3.Elaboration des constructions portant les gènes d'intérêt	44
6.4.Mutagenèse aléatoire du dipeptide EG2	44
7. PRÉPARATION DES EXTRAITS CELLULAIRES	46
8. SYSTEMES D'EXPRESSION	46
8.1.Système TNT7/lysate de réticulocytes	46
8.2.Système vaccine T7/cellules de rein de lapin	46
9. TECHNIQUES D'ANALYSE DES PRODUITS D'EXPRESSION	47
9.1.Gel de séparation SDS-PAGE	47
9.2.La technique du western-blot	47
9.3.Immunoprécipitation	47
10. MESURE DE L'ACTIVITÉ LUCIFÉRASE (NGUYEN ET AL., 1988)	47
RESULTATS	49
1. VALIDATION DE LA TECHNIQUE	50
2. IDENTIFICATION DES SITES DE MATURATION	54
2.1.Recherche de nouveaux sites de maturation après clivage en <i>cis</i> par la protéase 3CL	54
2.2.Efficacité de coupure en <i>cis</i> de la protéase 3CY	58
2.3.Délimitation de l'activité de la protéase 3C-like	61
2.4.Localisation de nouveaux sites de clivage par activité <i>trans</i> de la protéase	63

2.5.Effet de la complémentation sur l'efficacité de clivage	68
2.6.Mutagenèse aléatoire sur le dipeptide EG2 (143-144)	71
3. MATURATION DE LA POLYPROTÉINE DU RHDV	72
3.1.Etude cinétique de la maturation de la polyprotéine	72
3.2.Identification des intermédiaires de maturation comportant VP60 et 3D	73
3.3.Etude de la maturation de la polyprotéine en présence de la protéase 3CY ou 3CD	76
4. RECHERCHE DE COFACTEURS IMPLIQUÉS DANS LA MATURATION DE LA POLYPROTÉINE	77
4.1.Les cofacteurs d'origine virale :	77
4.2.Les cofacteurs d'origine cellulaire :	79
DISCUSSION	83
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	96

1. LA FAMILLE DES CALICIVIRIDAE

1.1. Taxonomie

1.1.1. L'historique de la famille

Les plus anciens membres de cette famille sont le Vesicular Exanthema of Swine Virus (VESV), le Feline CaliciVirus (FCV) et le San Miguel Sea lion Virus (SMSV).

Le VESV, virus prototype de la famille des *Caliciviridae* (Burroughs *et al.*, 1978), fut responsable d'exanthèmes vésiculaires épizootiques chez le porc de 1932 à 1959 (Smith and Akers 1976). D'abord limité à la Californie, en 1952, il atteignit la majorité des élevages de porcs des Etats Unis. Il fut éradiqué en 1959.

Le Feline CaliciVirus (FCV) est isolé dès 1957 (Fastier 1957). Il s'agit d'un virus ubiquitaire qui est la cause majeure des maladies respiratoires et des stomatites aiguës du chat (Gaskell 1985). Malgré une vaccination largement utilisée contre le FCV, de nombreux cas de pathologie liée à FCV sont relevés parmi les chats vaccinés et le taux d'infections par FCV demeure constant dans la population féline (Dawson *et al.*, 1993, Harbour *et al.*, 1991). Il semblerait que les vaccins accessibles sur le marché efficaces contre les souches de FCV de laboratoire, soient peu voire pas efficaces contre les souches sauvages (Hohdatsu *et al.*, 1999, Norsworthy 1999).

En 1972, le SMSV fut isolé à partir d'un prélèvement rectal réalisé sur une otarie en Californie (Smith *et al.*, 1973). Par la suite, plusieurs sérotypes ont été isolés sur divers mammifères marins et terrestres de la côte pacifique du continent Nord américain (Smith and Boyt 1990).

Les calicivirus ont tout d'abord été considérés comme un genre dans la famille des *Picornaviridae* (Fenner 1976). En effet, le VESV se rapprochait des genres *Enterovirus* et *Rhinovirus* par la relative petite taille de sa capsid, son ARN simple brin non segmenté et sa réplication localisée dans le cytoplasme. Par ailleurs, les animaux atteints par le VESV montraient des signes cliniques identiques à ceux atteints par la fièvre aphteuse (FMDV). Par la suite, l'accumulation des connaissances sur ces virus a conduit à ériger les calicivirus en une famille à part entière (Cooper *et al.*, 1978). Depuis, d'autres virus, physico-chimiquement et morphologiquement apparentés au VESV, isolés de divers mammifères, ont été intégrés ou associés à la famille des *Caliciviridae* (tableau 1).

1.1.2. Phylogénie et classification

Pour qu'un virus soit intégré dans la famille des *Caliciviridae*, il doit impérativement répondre à 4 critères :

- Avoir un génome constitué d'un ARN simple brin de polarité positive, polyadénylé
- Présenter une petite protéine (VPg pour Viral Protein linked to the genome) covalamment liée à l'extrémité 5' de son génome
- Présenter une capsidie de symétrie icosaédrique composée d'une seule protéine, la protéine structurale majeure
- En analyse phylogénétique, former un groupe monophylétique ayant un ancêtre commun

La famille autrefois constituée d'un seul genre est maintenant subdivisée en 4 genres (Pringle 1999). Le genre *Vesivirus* comprend VESV, SMSV et FCV. Le genre *Lagovirus* comprend RHDV et EBHSV. Les 2 derniers genres qui ont temporairement pour nom "Norwalk-like virus" et "Sapporo-like virus" comprennent les calicivirus isolés chez l'homme.

A part ces virus qui sont les plus connus, de nombreux autres calicivirus ont été répertoriés. A ce jour, tous n'ont pas été rattachés à un genre de la famille (tableau 1). Trois calicivirus ont un statut particulier. Il s'agit du Canine CaliciVirus (CaCV), du Bovine Enteric Calicivirus (BEV) et du Porcine Enteric Calicivirus (PEC). Ces 3 virus ont toutes les caractéristiques requises pour être rattachés à la famille des *Caliviridae* et par analyse génétique ont pu être inclus dans un genre de la famille. Ainsi, le CaCV, isolé de chien présentant une diarrhée mortelle (Mochizuki *et al.*, 1993), a été pressenti pour appartenir au genre *Vesivirus* au sein duquel il formerait un génogroupe différent des génogroupes SMSV et FCV (Hashimoto *et al.*, 1999). Le BEV, associé aux diarrhées dans les troupeaux de vaches laitières, forme une nouvelle branche au sein du genre Norwalk-like virus (Liu *et al.*, 1999). Le PEC, associé aux diarrhées chez le porc (Flynn *et al.*, 1988), permet de définir un nouveau génogroupe au sein du genre Sapporo-like virus (Guo *et al.*, 1999). Il faut noter que le BEV et le PEC sont les premiers calicivirus animaux à s'insérer parmi les calicivirus humains que ce soit parmi les Human CaliciVirus (HuCV) ou les Small Round Structured Virus (SRSV).

Tableau 1 : Famille des *Caliciviridae*

GENRE	NOM	HOTE	PATHOLOGIE	REFERENCES
<i>Vesivirus</i>	VESV Vesicular Exanthema of Swine Virus	Porc	Exanthèmes vésiculaires	(Neill et al., 1995, Smith and Akers 1976)
	FCV Felin CaliciVirus	Chat	Pneumonies et Stomatites aiguës	(Berke et al., 1997, Hoover and Kahn 1975)
	SMSV San Miguel Sea Lion Virus	Pinnipèdes	Exanthèmes vésiculaires	(Burroughs et al., 1978, Neill et al., 1995)
	BCV Bovine CaliciVirus	Bovins	Maladie respiratoire	(Neill and Seal 1995)
	PCV Primate CaliciVirus	Primates	Maladie vésiculaire	(Berke et al., 1997, Smith et al., 1983)
	CCV Cetecean CaliciVirus	Cétacés	Maladie vésiculaire	(Matson et al., 1996, Smith et al., 1983)
	SCV Skunk CaliciVirus	Mouffette	Asymptomatique	(Neill et al., 1995, Seal et al., 1995)
	RCV Reptile CaliciVirus	Reptiles	Asymptomatique	(Matson et al., 1996, Smith et al., 1986)
<i>Lagovirus</i>	RHDV Rabbit Haemorrhagic Disease Virus	Lapin	Hépatites aiguës fulminantes associées à une coagulation intravasculaire disséminée	(Berke et al., 1997, Ohlinger and Thiel 1991)
	EBHSV European Brown Hare Syndrom Virus	Lièvre		(Berke et al., 1997, Wirblich et al., 1994)
Norwalk-like virus	SRSV Small Round Structured Virus SRSV1 Norwalk virus SRSV2 Snow Mountain Virus	Homme	Gastro-entérites	(Matson et al., 1995)
Sapporo-like virus	HuCV Human CaliciVirus Sapporo Virus Manchester Virus	Homme	Gastro-entérites	(Berke et al., 1997, Liu et al., 1995)
Non assignés	Chicken calicivirus	Poulet	Rachitisme	(Cubitt and Barrett 1985)
	White tern	Sterne	Maladie vésiculaire	(Poet et al., 1996)
	Lion calicivirus	Lion	Maladie vésiculaire	(Kadoi et al., 1997)
	Mink calicivirus	Vison	Asymptomatique	(Long et al., 1980)

1.1.3. Le cas particulier du virus de l'hépatite E (HEV)

Le virus HEV est la cause majeure d'hépatites virales aiguës non-A non-B à transmission oro-fécale chez l'homme. Il est endémique dans de nombreuses régions du monde (Wattre 1994). Sur la base des caractéristiques morphologiques et des propriétés physico-chimiques des particules virales, il a été fait l'hypothèse que le virus HEV pouvait appartenir à la famille des *Caliciviridae* (Bradley 1990). Il faut noter que l'organisation génomique du HEV est similaire à celle des calicivirus (Tam *et al.*, 1991). Cependant, le génome du HEV semble être coiffé et non lié covalamment à une VPg. Or, il s'agit d'une caractéristique fondamentale de la famille des *Caliciviridae* (Pringle 1999). De plus, la polyprotéine du HEV possède un motif conservé caractéristique des protéases papaïne-like et non d'une protéase trypsine-like comme tous les calicivirus.

Par ailleurs, l'analyse comparative des séquences de la polymérase et de l'hélicase a rapproché le virus HEV du RubV (Rubella Virus) et du BNYVV (Beet Necrotic Yellow Vein Virus), 2 virus appartenant à la super famille des alpha-like virus (Koonin *et al.*, 1992). Cependant, l'organisation génomique du HEV est différente de l'organisation génomique des alpha-like virus et, par ailleurs, le génome du HEV montre une différence majeure qui est l'absence des gènes codant pour les glycoprotéines (Koonin *et al.*, 1992).

Aucune des 2 possibilités n'étant satisfaisante, HEV, anciennement rattaché à la famille des *Caliciviridae*, est actuellement transféré dans un genre non assigné à une famille, nommé provisoirement Hepatitis E-like virus (Pringle 1999).

1.2. Virion et composants

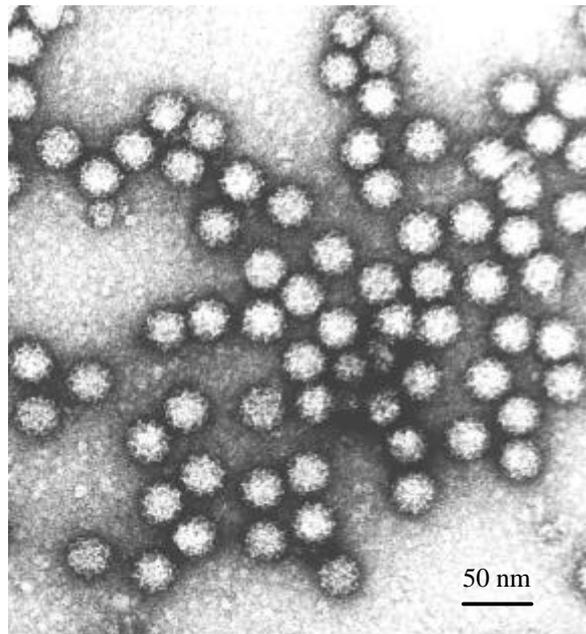


Figure 1 : Micrographie de particules virales du RHDV.

Les calicivirus doivent leur nom aux dépressions en forme de calices observées en microscopie électronique (Fig. 1) à la surface de certains virus de la famille (Liu *et al.*, 1997, Parra and Prieto 1990). Ce sont des virus non enveloppés et leur taille est comprise entre 30 et 40 nm (Thiel and König 1999). Les calicivirus sont instables à des pH inférieurs à 3, ils ont une stabilité variable à des pH compris entre 3 et 5, et ils sont stables à des pH supérieurs à 5. Ils sont inactivés par chauffage à 50°C pendant 30 min. Leur densité en gradient de CsCl varie entre 1,36 et 1,41 g/cm³ et leur coefficient de sédimentation en gradient de sucrose entre 170 et 183S (Schaffer *et al.*, 1980, Studdert 1978).

Les virus de la famille des *Caliciviridae* sont particuliers dans le monde des virus animaux du fait que leur capsid n'est composée que d'une seule protéine structurale. Cette simplicité de structure est plus habituelle chez les virus de plantes.

L'analyse structurale des pseudoparticules du Norwalk virus (NV) a été effectuée par 2 approches successives complémentaires : la cryomicroscopie électronique et traitement d'image par ordinateur à 22 Å de résolution (Prasad *et al.*, 1994) et la cristallographie à 3,4 Å de résolution (Prasad *et al.*, 1999).

Ces études ont permis de montrer que les capsides de calicivirus sont des icosaèdres de symétrie T=3 formés de 180 molécules de la protéine de structure majeure organisées en 90 dimères. La structure de l'icosaèdre montre des protubérances sur les axes 2 et des dépressions sur les axes 5 et 3. La protéine de capsidite présente un domaine globulaire (P) relié au domaine S par une charnière flexible. Le domaine S, constitué de 8 feuilletts β , est impliqué dans la formation du squelette de la capsidite. Le domaine P entre dans la formation des protubérances. Une partie du domaine P montre une structure similaire au domaine 2 du facteur d'élongation eucaryote EF-Tu. Ce sous-domaine, situé à l'extérieur de la capsidite, est variable parmi les virus du genre Norwalk-like virus et pourrait être un déterminant de la spécificité de souche et de la fixation à la cellule hôte.

Les particules des calicivirus sont composées de la protéine structurale majeure, d'une protéine codée par l'ORF (Open Reading Frame) de l'extrémité 3' du génome, de la VPg et de l'ARN génomique.

Le génome viral est un ARN simple brin, de polarité positive, polyadénylé en 5' avec une taille d'environ 7,5 kb. En plus de l'ARN génomique, il a été décrit chez différents calicivirus animaux l'existence d'un ARN subgénomique (Fig. 2) de 2,2 à 2,7 kb (Dunham *et al.*, 1998, Ehresmann and Schaffer 1979, Herbert *et al.*, 1996, Meyers *et al.*, 1991, Wirblich *et al.*, 1994). Il a été démontré chez RHDV que cet ARN subgénomique était présent dans les particules virales (Meyers *et al.*, 1991). Un rapport préliminaire, faisant référence à des tests d'hybridation *in situ* réalisés sur de l'ARN viral ou sur des échantillons de fèces humains infectés, suggère l'existence d'un ARN subgénomique de plus de 2 kb chez NV (Jiang *et al.*, 1993).

En plus de la protéine structurale majeure, 2 autres protéines ont été décrites dans les particules, la VPg et une protéine codée par l'ORF de l'extrémité 3' du génome des calicivirus. La VPg est liée covalamment à l'extrémité 5' des ARN génomique et subgénomique (Burroughs and Brown 1978, Dunham *et al.*, 1998, Herbert *et al.*, 1997, Meyers *et al.*, 1991). L'ORF située à l'extrémité 3' du génome des calicivirus coderait pour une protéine structurale mineure nommée VP10 dans le cas du FCV et du RHDV (Guo *et al.*, 1999, Herbert *et al.*, 1996, Seah *et al.*, 1999). La présence effective de cette protéine dans les particules virales n'a été démontrée que dans le cas du RHDV (Wirblich *et al.*, 1996). Aucune recherche à ce propos n'a été publiée pour les autres espèces de calicivirus.

1.3. Structure et organisation génomique

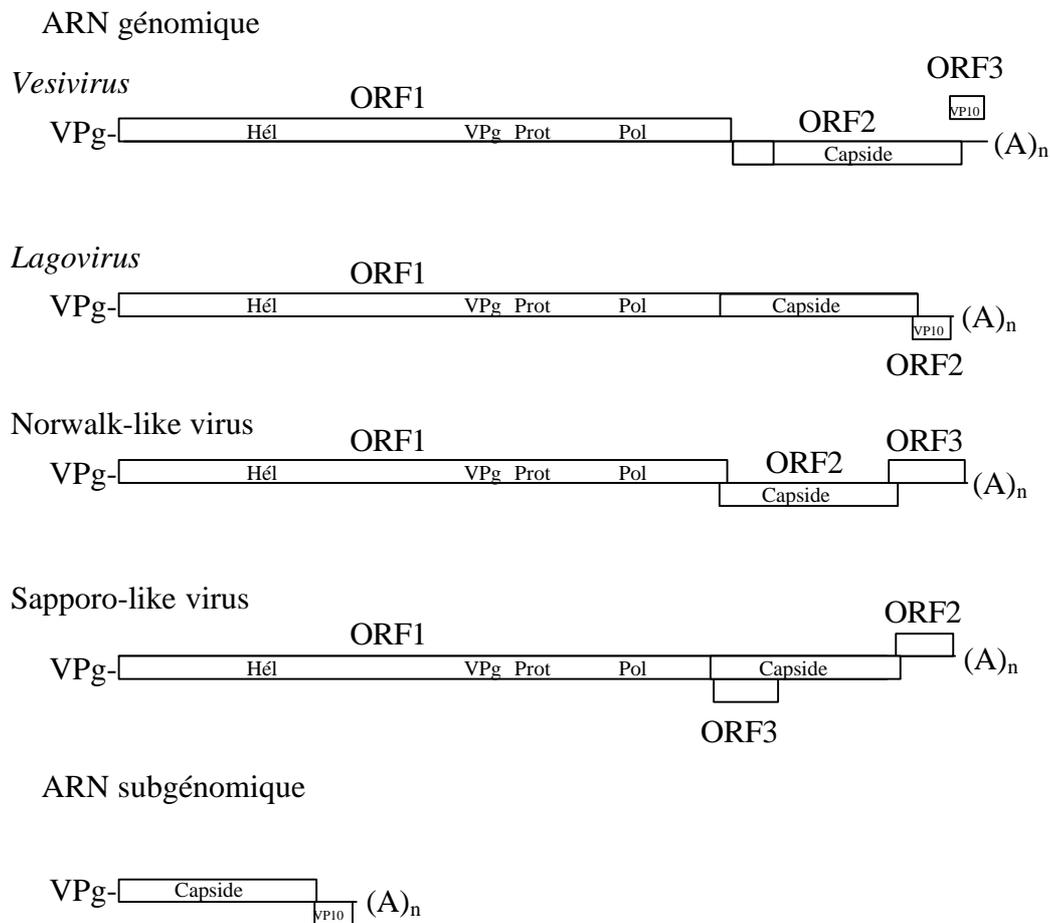


Figure 2 : Organisation génomique des calicivirus. Hél=Hélicase, Prot=Protéase, Pol=Polymérase.

Les séquences complètes des virus des 4 genres de la famille sont disponibles et, notamment, les séquences du FCV (Sosnovtsev and Green 1995), du PCV (Rinehart-Kim *et al.*, 1999), du RHDV (Rasschaert *et al.*, 1995), du NV (Lambden *et al.*, 1993), du Manchester virus (Liu *et al.*, 1997, Liu *et al.*, 1995) et du BEC (Liu *et al.*, 1999).

Les membres de la famille des *Caliciviridae* possèdent un génome dont la taille varie entre 7,3 et 8,3 kb avec un arrangement spécifique des différentes ORF (Fig. 2). Plus précisément, l'organisation génomique des calicivirus se caractérise par un large cadre de lecture (ORF1) codant pour une polyprotéine de plus de 190 kDa. Cette ORF débute en 5' du génome après une courte séquence non codante d'environ 15 nucléotides. La polyprotéine contient entre autre une hélicase, la VPg, une protéase 3C-like et une ARN polymérase ARN dépendante. Dans le cas des *Lagovirus* et des *Sapporo-like virus* le gène de la protéine majeure de capsid est en 3' de l'ORF1 contrairement aux *Vesivirus* et *Norwalk-like virus* où la protéine de capsid est codée par une ORF spécifique, l'ORF2. A l'extrémité 3' du génome de tous les calicivirus se trouve une petite ORF (317-806 nucléotides), codant pour la VP10 dans le cas du RHDV et du

FCV. Les Sapporo-like virus ont la particularité de présenter une ORF supplémentaire chevauchant l'extrémité 5' du gène de la capsid.

Il est important de noter qu'il existe une réelle corrélation entre l'analyse phylogénétique à partir des séquences nucléotidiques et les différents types d'organisation génomique que l'on trouve au sein de cette famille (Berke *et al.*, 1997, Clarke and Lambden 1997).

1.4. Le cycle viral

Les progrès lents dans l'étude du développement des calicivirus dans la cellule eucaryote vient du fait qu'il existe peu de système de culture simple et approprié pour la plupart des calicivirus. En fait, seuls les calicivirus du genre vésivirus semblent se multiplier dans des cellules en culture (Dunham *et al.*, 1998, Carter *et al.*, 1990, Burroughs *et al.*, 1978, Matson *et al.*, 1996).

1.4.1. Les phases précoces de l'infection

Trois grands travaux majeurs menés parallèlement chez NV, FCV et RHDV ont permis d'obtenir de premiers renseignements sur les étapes de fixation et d'internalisation des calicivirus (White *et al.*, 1996, Ruvoen-Clouet *et al.*, 1995, Kreutz *et al.*, 1995, Kreutz *et al.*, 1994). Il est important de noter que les études menées sur le virus FCV sont les plus représentatives du fait de sa capacité à se répliquer en culture de cellules.

Une première étude sur les caractéristiques de fixation du FCV sur des cellules de reins de chat (CRFK) a permis de mieux cerner la nature du récepteur au FCV. Il s'agit d'un récepteur carbohydraté saturable dont la reconnaissance par le virus est dépendante d'ions divalents. En effet, le traitement des cellules aux neuramidases suivi d'un traitement aux O-glycanases induisent une nette diminution du taux de fixation. Par ailleurs, la non répllication du FCV dans les cellules non permissives est essentiellement due à l'absence d'un récepteur approprié, en effet, ces cellules transfectées par l'ARN viral permettent la production de virions. (Kreutz *et al.*, 1994). Une deuxième étude montre que l'ajout au milieu de culture de chloroquine, qui permet de prévenir l'acidification intracellulaire, n'a d'effet sur la production de virus infectieux que dans les 3 à 4 premières heures pi. Ces résultats ont conduit les auteurs à proposer un mécanisme d'endocytose nécessitant une acidification intracellulaire pour l'entrée du FCV dans les cellules cibles (Kreutz and Seal 1995).

Une étude visant, de manière indirecte, à identifier le récepteur du RHDV, a montré que comme dans le cas du FCV, le RHDV se fixerait sur des molécules carbohydratées (Ruvoen-Clouet *et al.*, 1995).

La possibilité de purifier une grande quantité de pseudoparticules de NV a permis d'étudier leur fixation sur différentes lignées cellulaires et leur internalisation. La nature du récepteur au NV semble être la même quelle que soit la lignée cellulaire et le taux de fixation du virus semble plutôt dépendant du nombre de molécules à la surface cellulaire. Les pseudoparticules se fixent de façon spécifique à un récepteur saturable. La constante d'affinité est la même quelle que soit la lignée cellulaire étudiée. Les Caco-2 (cellules différenciées originaires d'adénocarcinomes de colon humain) sont les cellules qui fixent le mieux le virus, cependant, le pourcentage de fixation reste faible (18%). De plus, aux maximum 6,8% des pseudoparticules virales seraient internalisées. Par ailleurs, les expériences d'inhibition de fixation par l'utilisation

d'Ac monoclonaux et polyclonaux dirigés contre les pseudoparticules du NV ont établi que la région C-terminale, située entre les résidus 300 et 384 de la protéine majeure de capsid, est impliquée dans l'interaction des pseudoparticules avec les cellules (White *et al.*, 1996).

1.4.2. Réplication du génome

Les calicivirus sont des virus non enveloppés à ARN dont le cycle de réplication relativement court (8h) semble avoir une localisation uniquement cytoplasmique (Studdert 1978). Tous les calicivirus présentent un ARN génomique d'environ 7,5 kb et un ARN subgénomique d'environ 2,2 kb (Dunham *et al.*, 1998, Herbert *et al.*, 1996, Jiang *et al.*, 1993, Meyers *et al.*, 1991, Wirblich *et al.*, 1994). Cependant, les travaux sur les calicivirus adaptés à la culture de cellule (FCV, SMSV) font état en plus des ARN génomique et subgénomique de la présence de plusieurs populations de molécules d'ARN exprimées par les cellules infectées. En effet, il a été décrit dans les cellules infectées par SMSV 4 ARN différents : l'ARN génomique 36S, l'ARN subgénomique 22S et 2 autres correspondant aux formes double brin des ARN génomique et subgénomique (Ehresmann and Schaffer 1977, Ehresmann and Schaffer 1979). Des analyses plus fines chez FCV ont pu mettre en évidence la présence d'ARN anti-sens des ARN génomique et subgénomique (Carter 1990).

La famille des *Caliciviridae* a pour autre caractéristique d'avoir une séquence répétée non codante d'environ 15 nucléotides en 5' des ARN génomique et subgénomique (Lambden *et al.*, 1995). Cette structure conservée est probablement impliquée dans un mécanisme de régulation (encapsidation, réplication, transcription des ARN...).

1.4.3. Synthèse protéique et maturation

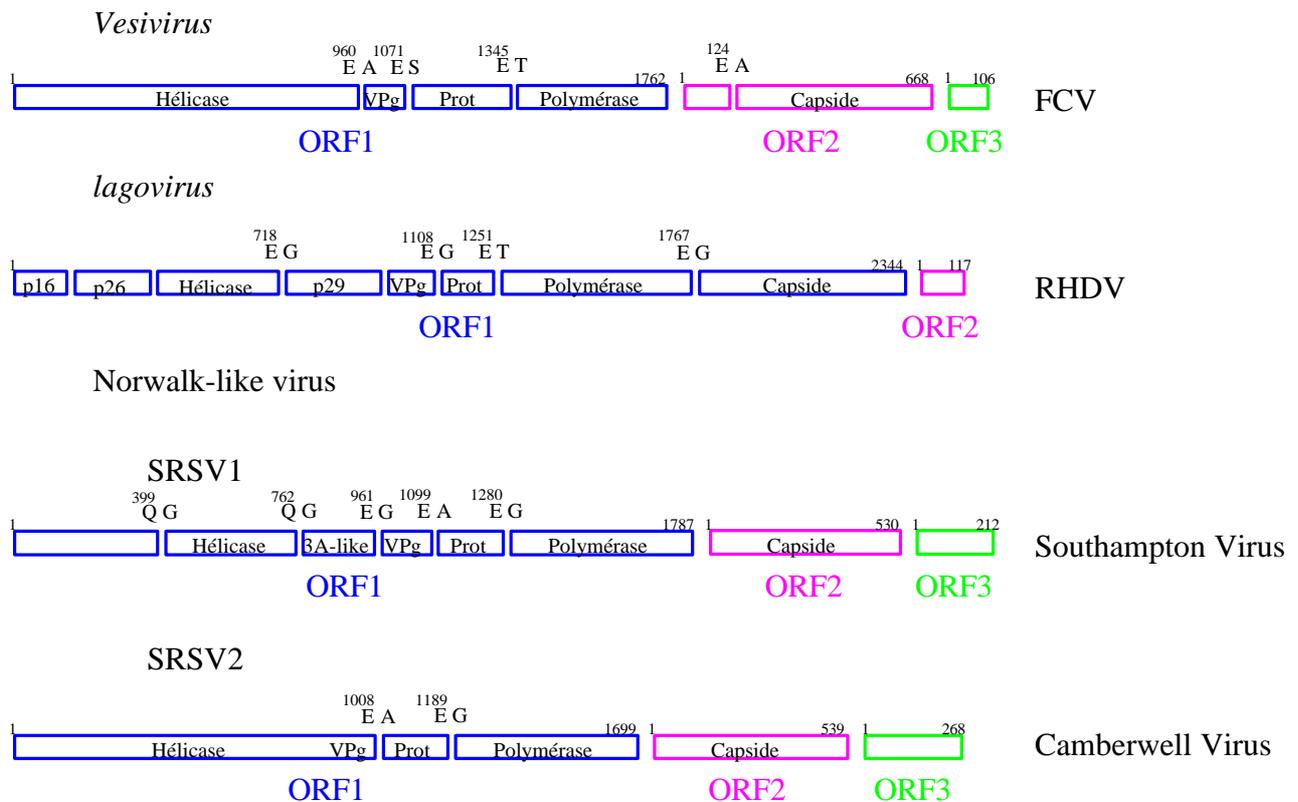


Figure 3 : Représentation schématique du processus de maturation chez les calicivirus. Les ORF sont représentées par des rectangles bleus (ORF1), rose (ORF2) ou verts (ORF3). Les sites de clivage sont indiqués par une rupture de l'ORF. Les acides aminés impliqués dans le clivage sont indiqués au-dessus des ORF. Le nom des protéines correspond à leur fonction lorsqu'elle est déterminée. Les protéines p16, p26, p29 et 3A-like sont des protéines dont la fonction n'a pas encore été déterminée.

Les ARN génomique et subgénomique sont des ARN messagers. L'ARN génomique code pour la polyprotéine et les protéines des ORF supplémentaires et, l'ARN subgénomique code pour la protéine de capsid et les protéines correspondant aux ORF supplémentaires.

- La polyprotéine

Quel que soit le calicivirus, la polyprotéine, dont la taille peut varier de 190 à 260 kDa (Carter *et al.*, 1992, Jiang *et al.*, 1993, Liu *et al.*, 1997, Meyers *et al.*, 1991), est codée par l'ORF1 du génome (Fig. 3). L'alignement des séquences génomiques des calicivirus avec les séquences génomiques des picornavirus a permis de constater la remarquable similarité dans l'agencement des protéines virales au sein de la polyprotéine. Le génome des picornavirus code pour une polyprotéine présentant en sa partie N-terminale les protéines de capsid et en sa partie C-terminale les protéines non structurales et la VPg. Cependant, l'organisation des protéines au sein de la polyprotéine chez les calicivirus (Fig. 2) est voisine de celle décrite chez les picornavirus. Notamment, l'ordre des 3 protéines non structurales homologues entre les 2 familles ; une hélicase (2C), une protéase à cystéine (3C) et une ARN polymérase ARN dépendante (3D). Par contre, aucune autre homologie n'a pu être trouvée pour les autres

protéines non structurales (Jiang *et al.*, 1993, Meyers *et al.*, 1991, Wirblich *et al.*, 1996). La libération de ces protéines se fait par maturation de la polyprotéine. Le processus de maturation a essentiellement été étudié chez FCV (Sosnovtseva *et al.*, 1999), RHDV (Boniotti *et al.*, 1994, König *et al.*, 1998, Wirblich *et al.*, 1995, Wirblich *et al.*, 1996), Southampton virus (Liu *et al.*, 1996, Liu *et al.*, 1999) et Camberwell virus (Seah *et al.*, 1999) (Fig. 3).

Il faut noter que peu de données sont disponibles sur la fonction des protéines portées par la polyprotéine.

L'hélicase : l'analyse de séquences a permis de trouver un domaine fonctionnel de la polyprotéine homologue à la protéine 2C des picornavirus, notamment, le motif GxxGxGKT/S, consensus chez les hélicases, impliqué dans la fixation aux acides nucléiques. Chez les calicivirus, ce motif est très conservé puisque seul un acide aminé varie, GxPGIGKT (Dingle *et al.*, 1995, Guo *et al.*, 1999, Meyers *et al.*, 1991). Par ailleurs, grâce aux études sur la maturation de la polyprotéine menée chez RHDV et Southampton virus, la taille de l'hélicase a pu être estimée à 40 kDa (König *et al.*, 1998, Liu *et al.*, 1996).

La VPg : Les ARN génomique et subgénomique présentent une petite protéine liée covalamment à leur extrémité 5' (Herbert *et al.*, 1997, Meyers *et al.*, 1991, Schaffer *et al.*, 1980). La taille apparente de cette protéine varie entre 14 et 22 kDa et semble toujours supérieure à la taille déduite à partir de la séquence en acides aminés (12 à 16 kDa) (Herbert *et al.*, 1997, König *et al.*, 1998, Liu *et al.*, 1999). Quoiqu'il en soit, comparée à la VPg des picornavirus (dont la taille est inférieure à 8kDa), la VPg des calicivirus est de grande taille (Falk *et al.*, 1992, Nomoto *et al.*, 1977). Par ailleurs, cette protéine montre une extrémité N-terminale très hydrophile avec 2 motifs conservés parmi les calicivirus : KGKN/TK et D/EEYD/EE (Dunham *et al.*, 1998). La VPg est indispensable à l'infectivité de l'ARN génomique des calicivirus (Dunham *et al.*, 1998, Herbert *et al.*, 1997). Le fait qu'en culture cellulaire la VPg puisse être remplacée dans sa fonction par un analogue de coiffe (Sosnovtsev and Green 1995) et le fait qu'il y ait une similarité de séquence entre la VPg et le facteur d'initiation eucaryote eIF1A (Sosnovtseva *et al.*, 1999) tendraient à montrer un possible rôle de la VPg dans l'initiation de la traduction.

La protéase à cystéine: la protéase 3C-like des calicivirus a été définie par analogie de séquence avec la protéase trypsine-like à cystéine (3C) que l'on retrouve chez les membres de la famille des *Picornaviridae* (Dougherty and Semler 1993). Sa taille, plus petite que chez les picornavirus, varie entre 15 et 19 kDa. Deux histidines, un acide aspartique/glutamique et une cystéine conservés forment le domaine fonctionnel. La cystéine est présente dans un motif conservé GDCG et est, certainement, le site catalytique nucléophile qui confère l'activité protéolytique à la protéine (Boniotti *et al.*, 1994, Liu *et al.*, 1996, Seah *et al.*, 1999, Sosnovtseva *et al.*, 1999). A ce jour, la protéase 3C-like semble être la seule protéine des calicivirus présentant une activité protéolytique.

L'activité de cette protéase a été étudiée dans différents systèmes artificiels eucaryotes ou bactériens. Cette activité se manifeste en *cis* et en *trans*. Les sites cibles exacts de cette protéase ont été déterminés par mutagenèse dirigée ou par séquençage des extrémités N-terminales des produits de clivage. Par convention, pour décrire les interactions entre la protéase et son substrat, nous avons adopté la nomenclature Schechter et Berger (Schechter

and Berger 1967). Brièvement, les acides aminés situés du côté N-terminal de la liaison peptidique cible sont nommés P3, P2, P1 et du côté C-terminal P1', P2', P3'. Ces différentes analyses ont montré que la protéase 3C-like des calicivirus tolère un nombre limité d'acides aminés en position P1 et P1' du site de clivage. En position P1, seuls l'acide glutamique (E) et la glutamine (Q) ont permis jusqu'alors une activité protéolytique. En position P1', la nature de l'acide aminé est moins restreinte, il semble qu'il faille un acide aminé avec un encombrement stérique faible tels que la glycine (G), l'alanine (A), la sérine (S) ou la thréonine (T) (Boniotti *et al.*, 1994, Liu *et al.*, 1996, Liu *et al.*, 1999, Martin Alonso *et al.*, 1996, Seah *et al.*, 1999, Wirblich *et al.*, 1995).

Il est important de noter que le clivage entre la protéase 3C-like et la polymérase est souvent décrit comme faiblement efficace. Par ailleurs, la molécule intermédiaire 3CD semble être une molécule stable que l'on retrouve dans les cellules infectées (König *et al.*, 1998, Sosnovtsev *et al.*, 1998). Ces 2 résultats suggèrent un mécanisme de régulation lors de la maturation des protéines.

Par ailleurs, dans le cas des vésivirus, il a été rapporté que la protéase 3C-like était responsable du clivage par une activité *trans* de la molécule précurseur de capsidie issue de l'ORF2 et permettait, ainsi, la production de la protéine de capsidie mature (Matsuura *et al.*, 2000, Sosnovtsev *et al.*, 1998).

L'ARN polymérase ARN dépendante : l'analyse de séquence a permis de retrouver sur la polyprotéine de tous les calicivirus les motifs GLPSG et YGDD caractéristiques des ARN polymérase ARN dépendante des virus à ARN de polarité positive (Jiang *et al.*, 1993, Liu *et al.*, 1995). L'ARN polymérase des calicivirus présente une taille d'environ 57 kDa (König *et al.*, 1998, Liu *et al.*, 1999, Seah *et al.*, 1999). La fonctionnalité de la polymérase sous sa forme 3D a été démontrée dans un système hétérologue uniquement chez RHDV (Vazquez *et al.*, 1998). Cette protéine est capable de synthétiser à partir d'ARN synthétique polyadénylé un ARN complémentaire de polarité négative en présence d'oligonucléotides U.

- La protéine majeure de capsidie :

La production de la protéine de capsidie est certainement réalisée à partir de l'ARN subgénomique des calicivirus. Cela dit, pour les Sapporo-like virus et pour les lagovirus, la question de la provenance de la protéine de capsidie par traduction à partir de l'ARN subgénomique ou par maturation de la polyprotéine peut se poser (Fig. 2 et 3). Chez RHDV, l'étude de la maturation de la polyprotéine a montré clairement l'existence d'un site de clivage entre l'ARN polymérase et la protéine de capsidie (Boniotti *et al.*, 1994, Wirblich *et al.*, 1995, Wirblich *et al.*, 1996). Par ailleurs, la production de la protéine majeure de capsidie par l'une ou l'autre des voies conduit à l'assemblage de pseudoparticules (Sibilia *et al.*, 1995). D'autre part, le séquençage de l'extrémité N-terminale de la protéine majeure de capsidie provenant de virions purifiés à partir de foie de lapin infecté montre que la protéine majeure de capsidie provient principalement de la traduction de l'ARN subgénomique (Parra *et al.*, 1993).

Par ailleurs, les vésivirus ont la particularité de produire un précurseur de la protéine de capsidie (Fretz and Schaffer 1978, Matsuura *et al.*, 2000, Sosnovtsev *et al.*, 1998). Le clivage de la protéine précurseur permettant l'obtention de la protéine majeure de capsidie est essentiel au cycle productif du virus et est réalisé à un site spécifique par la protéase 3C-like.

La protéine de capsidie dont la taille varie entre 57 et 62 kDa est le constituant majeur de la capsidie des calicivirus. Cette protéine a la propriété de s'auto-assembler en pseudoparticules qui ont les mêmes caractéristiques morphologiques et antigéniques que les virions infectieux (Geissler *et al.*, 1999, Jiang *et al.*, 1997, Jiang *et al.*, 1995, Laurent *et al.*, 1997, Laurent *et al.*, 1994).

Cette propriété a été utilisée dans des essais de vaccination contre NV chez l'homme et contre RHDV chez le lapin. L'administration de pseudoparticules du NV par voie orale chez l'homme adulte est immunogène et n'entraîne aucun effet secondaire. La réponse immunitaire humorale induite par l'administration orale de pseudoparticules est similaire à la réponse à l'infection naturelle par NV. Que ce soit dans le cas de l'infection induite ou dans le cas de l'infection naturelle, on constate une augmentation des IgG1 et des IgA. Cependant, la protection induite par les pseudoparticules n'a pas été testée (Ball *et al.*, 1999). Chez le lapin, la vaccination intramusculaire par des pseudoparticules du RHDV confère une protection totale. Cette protection est effective dès le 5^{ème} jour pi et est accompagnée d'une forte réponse humorale (Laurent *et al.*, 1994).

La protéine issue de l'ORF située en 3' du génome :

A l'extrémité 3' du génome de tous les calicivirus se trouve une petite ORF. Cette ORF présente une taille (317-806 nucléotides) et une séquence qui varient énormément entre les membres des calicivirus. Cependant, chez tous les calicivirus, la protéine codée par cette ORF est une protéine extrêmement hydrophile riche en acides aminés basiques. Cette caractéristique suggère que la fonction de cette protéine implique une interaction protéine-protéine et/ou protéine-acide nucléique. Elle est exprimée à partir de l'ARN subgénomique avec un taux de 10% par rapport à l'expression de la protéine majeure de capsidie dans les cellules infectées (Herbert *et al.*, 1996). Contrairement à ce qu'il avait été suggéré, cette protéine n'est pas indispensable à la formation de la capsidie (Laurent *et al.*, 1994). Cependant, la présence de cette protéine dans les virions, démontrée chez RHDV, suggère qu'elle puisse jouer un rôle dans la reconnaissance et l'encapsidation de l'ARN viral (Wirblich *et al.*, 1996).

- L'ORF supplémentaire des Sapporo-like virus :

Cette ORF déduite par analyse de séquence est une caractéristique des Sapporo-like virus. Il s'agit d'une ORF de 483 nucléotides qui coderait pour une petite protéine basique de 161 acides aminés. Il faut noter que le codon d'initiation de cette ORF est dans un contexte très favorable à l'initiation d'une traduction (Liu *et al.*, 1995).

2. LE RHDV

2.1. Histoire

Le Rabbit Haemorrhagic Disease Virus (RHDV) est responsable d'une maladie hautement contagieuse et fatale chez les lapins domestiques et sauvages. Cette maladie est apparue pour la première fois en Chine en 1984 puis en Corée en 1985 (Liu *et al.*, 1984, Park *et al.*, 1987). En 1986, une épizootie a touché le continent européen à partir de 2 foyers, l'Italie (Cancellotti

and Renzi 1991) et l'Europe de l'Est (Rodak *et al.*, 1991). Depuis, cette maladie a atteint de nombreux pays européens tels que l'Espagne (Villafuerte *et al.*, 1994), la France (Morisse *et al.*, 1991), la Grande Bretagne (Fuller *et al.*, 1993), l'Irlande (Collery *et al.*, 1995) entraînant d'importantes pertes économiques liées à la décimation des élevages de lapins fermiers mais aussi une mise en danger des lapins sauvages. Aussi, dès 1989, l'Office International des Epizooties déclara la maladie hémorragique du lapin comme faisant partie de la liste B des maladies contagieuses (Morisse *et al.*, 1991). Une étude épidémiologique réalisée en France, où la maladie est endémique, sur la période de 1988 à 1995 a montré que le panel des isolats français était issu d'une épizootie (1988-1989) causé par l'entrée en France de 2 génotypes différents, un par le sud (Italie) et un par l'est (Allemagne) (Le Gall *et al.*, 1998).

Cette maladie a aussi affecté d'autres continents. En 1988, elle a été introduite au Mexique par l'intermédiaire de carcasses infectées provenant de Chine. La mise en place d'un programme d'éradication établi en 1989 par le National System for Animal Health Emergencies a permis l'élimination complète de la maladie dès 1992 (Heneidi Zeckua *et al.*, 1997). Plusieurs pays africains ont également rapporté des épizooties dans les élevages de lapin (Abu Elzein and al-Afaleq 1999, Bouslama *et al.*, 1996, Kpodekon and Alogninouwa 1998). En Australie, le RHDV a été étudié comme un moyen de lutte biologique pour limiter la population de lapins, ceux-ci étant considérés comme une nuisance pour l'environnement. En 1995, le RHDV a été "malencontreusement" introduit en Australie à partir de l'île de Wardang où il était étudié sur des enclos expérimentaux de lapins (Holden 1995) puis de façon illégale en Nouvelle Zélande en 1997 (O'Keefe *et al.*, 1999).

Parallèlement, il a été rapporté une maladie ayant les mêmes caractéristiques que la maladie hémorragique du lapin mais hautement mortelle chez le lièvre brun sauvage et domestique (Poli *et al.*, 1991). Cette maladie est en fait due au European Brown Hare Syndrome Virus (EBHSV). Le EBHSV et le RHDV sont en fait 2 virus hautement affiliés (Laurent *et al.*, 1997, Le Gall *et al.*, 1996, Nowotny *et al.*, 1997) qui forment le genre *lagovirus* de la famille des *Caliciviridae* (Tab. 1). De plus, il a été montré que ces 2 virus étaient 2 sérotypes d'un même séro groupe viral (Laurent *et al.*, 1997).

2.2. Pathologie

2.2.1. Tableau clinique/cytopathologie

Les signes cliniques et les lésions décrits lors de la maladie hémorragique du lapin sont étonnamment sévères et très différents des autres calicivirus humains ou du genre vésivirus. Les symptômes de cette maladie sont peu évocateurs, d'apparition brutale et ils évoluent rapidement. Les lapins infectés peuvent présenter des signes d'anorexie, de difficultés respiratoires, d'opisthotonos et un saignement du nez avec une progression rapide (72h) vers la mort (Fuller *et al.*, 1993, Liu *et al.*, 1984, Ramiro-Ibanez *et al.*, 1999). L'autopsie révèle une obstruction thrombotique sévère des vaisseaux principaux tels que les artères pulmonaire, supra hépatique et aortique. Il s'agit d'une coagulation intravasculaire disséminée, caractéristique des fièvres hémorragiques virales. Elle est aussi la cause majeure de la pathogenèse et donc de l'atteinte sévère hépatique et pulmonaire (Alonso *et al.*, 1998, Ramiro-

Ibanez *et al.*, 1999). Des observations histopathologiques ont permis de détecter chez les lapins infectés une atteinte du foie et de la rate 30h pi, du thymus et des amygdales 36h pi et, des poumons, des ganglions lymphatiques et des reins 48h pi (Guittre *et al.*, 1996). La détection de l'ARN viral par RT-PCR dans les différents tissus atteints montre la présence dès 18h pi du RHDV dans le foie et la rate (Guittre *et al.*, 1996). Il est important de noter que les lapins de moins de 2 mois ne sont pas sensibles au RHDV (Mikami *et al.*, 1999).

Les lésions hépatiques sévères sont la conséquence d'un tropisme du virus pour les hépatocytes (Park *et al.*, 1992). Les cellules infectées par le RHDV dans les autres organes atteints ont pu être identifiées par une méthode de double marquage (Ramiro-Ibanez *et al.*, 1999). Il s'agit majoritairement de cellules phagocytaires mononucléaires telles que les macrophages des tissus hépatiques, pulmonaires ou spléniques mais aussi des monocytes circulants et des cellules de Küpffer. L'implication d'un mécanisme de nécrose cellulaire conduisant à la destruction tissulaire du foie lors de l'infection virale a été longtemps admise (Park *et al.*, 1992). En fait, RHDV induit la mort des cellules par apoptose. Plus précisément, l'apoptose est détectée au niveau des hépatocytes infectés 40h pi (Alonso *et al.*, 1998). Par ailleurs, il est admis que les cellules apoptotiques sont le siège d'une augmentation de l'activité pro coagulante (Casciola-Rosen *et al.*, 1996, Greeno *et al.*, 1996), ce qui pourrait expliquer l'observation du syndrome de coagulation intravasculaire disséminée associé à l'infection par le RHDV.

2.2.2. Transmission

La maladie hémorragique du lapin peut détruire un élevage de lapins en quelques jours. Cette capacité vient du fait qu'il s'agit d'une maladie hautement contagieuse de transmission horizontale par contact direct ou indirect et par diverses voies (Xu 1991). Plusieurs auteurs suggèrent la possibilité de l'intervention de vecteurs biologiques dans la transmission horizontale de la maladie tels que les mouches, les moustiques ou les puces (Asgari *et al.*, 1998, Lugton 1999). Par ailleurs, il a été détecté chez le renard sauvage la présence dans le sérum d'Ac anti-RHDV (Frolich *et al.*, 1998) et l'injection parentérale du RHDV chez le chien domestique a entraîné l'excrétion dans les fèces de virus infectieux (Simon *et al.*, 1994). De plus, cette maladie étant hautement mortelle, il s'est posé la question de la possibilité du passage du RHDV aux autres espèces animales. Lors des études menées chez le renard et le chien aucun signe clinique lié au RHDV n'a pu être relevé. De même, le lapin infecté par le EBHSV et, réciproquement, le lièvre infecté par le RHDV ne montrent aucun signe clinique. Dans les 2 cas, aucune protection croisée n'est observée (Laurent *et al.*, 1997, Lavazza *et al.*, 1996). Par ailleurs, il a été suggéré la possibilité de la transmission du RHDV à l'homme (Smith *et al.*, 1998). Mais une étude, menée auprès d'une population australienne exposée au RHDV, n'a montré aucune réponse Ac anti-RHDV dans les sérums et aucune incidence sur la santé de cette population (Carman *et al.*, 1998).

2.2.3. Variabilité génétique/pathogénicité

Deux études épidémiologiques basées sur l'analyse de séquences nucléotidiques du gène de la capsid ont été réalisées (Le Gall *et al.*, 1998, Nowotny *et al.*, 1997). Ces 2 analyses portent sur des isolats du RHDV provenant d'épizooties survenues entre 1987 et 1995. Elles révèlent la répartition des différents isolats en 3 génogroupes avec une homologie de séquence allant de 92 à 100%. La divergence entre les séquences analysées est due à une majorité de substitutions silencieuses. En terme de séquences en acides aminés, ces isolats montrent plus de 98% d'homologie. Cependant, depuis 1996, on a pu constater l'apparition de nouvelles souches RHDV présentant une variabilité génétique et pathogénique plus importante (Capucci *et al.*, 1998, Capucci *et al.*, 1996, Schirrneier *et al.*, 1999). En effet, 4 isolats (2 italiens et 2 allemands), dont 2 sont issus d'épidémies dans des élevages de lapins vaccinés, sont les représentants de nouveaux variants antigéniques du RHDV. Ces isolats montrent 98% d'homologie entre eux au niveau de la séquence peptidique de la protéine de capsid mais seulement 95% d'homologie avec les isolats antérieurs à 1996 (Capucci *et al.*, 1998, Schirrneier *et al.*, 1999). Enfin, un 3^{ème} calicivirus nommé RCV (Rabbit CaliciVirus) a été isolé chez le lapin. Il s'agit d'un calicivirus qui montre 91,5% d'homologie avec les souches RHDV antérieures à 1996 mais qui est non pathogène et présente un tropisme essentiellement intestinal chez le lapin. Un challenge par ce virus confère au lapin une protection efficace contre le RHDV (Capucci *et al.*, 1996).

2.2.4. Vaccination

Dès l'apparition de la maladie en Europe, des recherches intensives visant l'obtention d'un vaccin ont été menées (Arguello Villares 1991, Huang 1991, Rodak *et al.*, 1991). Ces recherches ont abouti au développement d'un vaccin commercialisé. Le vaccin est préparé à partir de broyats de foies de lapins expérimentalement infectés inactivés par du β -propiolactone pendant 24h à 37°C et adjuvés par de l'hydroxyde d'alumine. Ce vaccin permet une protection effective en 3 à 7 jours et son efficacité semble persister pendant 6 à 15 mois. Depuis, la mise en place d'une vaccination systématique a permis un contrôle de la maladie en Europe dans les élevages industriels malgré les quelques rares cas d'échappement décrits précédemment. Actuellement, un vaccin, basé sur la production de pseudoparticules du virus RHDV en système baculovirus/cellules d'insecte, serait en développement.

2.3. Le cycle viral

2.3.1. Le virion

Les virions purifiés à partir de foie de lapin infecté par le RHDV ont un diamètre de 35 nm et ils présentent à leur surface des dépressions en forme de calice (Laurent *et al.*, 1994). L'analyse en cryomicroscopie électronique et le traitement d'image par ordinateur des pseudoparticules du RHDV a montré la remarquable similarité entre les structures du RHDV et du NV. En effet, les pseudoparticules du RHDV sont des icosaèdres de symétrie T=3 formés de 180 molécules de la protéine majeure de capsid organisées en 90 dimères. La structure de l'icosaèdre

montre des protubérances sur les axes 2 et des dépressions sur les axes 5 et 3 (Thouvenin *et al.*, 1997).

2.3.2. Le récepteur cellulaire

Peu d'études ont été menées sur le récepteur du RHDV. En fait, une seule approche indirecte fondée sur la capacité du RHDV à agglutiner les érythrocytes humains a été réalisée (Ruvoen-Clouet *et al.*, 1995). Dans cette approche, les auteurs ont montré que les érythrocytes d'origine humaine sont agglutinés par le virus RHDV quel que soit le groupe A, B ou O et l'agglutination n'est pas modifiée par leur traitement aux protéases ou glycosidases. Aucune agglutination n'est obtenue avec des érythrocytes d'origine ombilicale ou fœtale et la capacité d'agglutination est inhibée par des extraits de lipides hautement glycosylés. Ces résultats semblent indiquer que le récepteur au RHDV, présent sur les cellules matures, serait de nature glycolipidique.

2.3.3. Réplication virale

Les connaissances sur la réplication du génome viral sont limitées du fait de l'absence d'un système de culture cellulaire efficace pour la réplication du virus RHDV. Cependant, il a été développé un test de fonctionnalité pour vérifier l'activité de l'ARN polymérase ARN dépendante (Vazquez *et al.*, 1998). La région codant pour l'ARN polymérase ARN dépendante du RHDV située entre les nucléotides 3763 et 5310 exprimée dans un système bactérien a permis la purification de l'enzyme de 58 kDa. Cette ARN polymérase purifiée montre une activité poly (U) polymérase poly (A) dépendante résistante à la rifampicine et à l'actinomycine D. Cette enzyme montre aussi une activité ARN polymérase *in vitro* en présence d'un ARN subgénomique synthétique avec ou sans une amorce poly (U). Cependant, en présence de l'amorce, il a été obtenu un ARN de même taille et de polarité négative alors qu'en absence d'amorce, il a été obtenu un ARN double brin dont les brins étaient liés covalamment à une de leur extrémité. Comme ce dernier résultat prévaut quelle que soit la nature de l'extrémité 3' de l'ARN matrice, il semble que ce phénomène soit dû à une aptitude intrinsèque à la polymérase.

2.3.4. Structure et organisation génomique

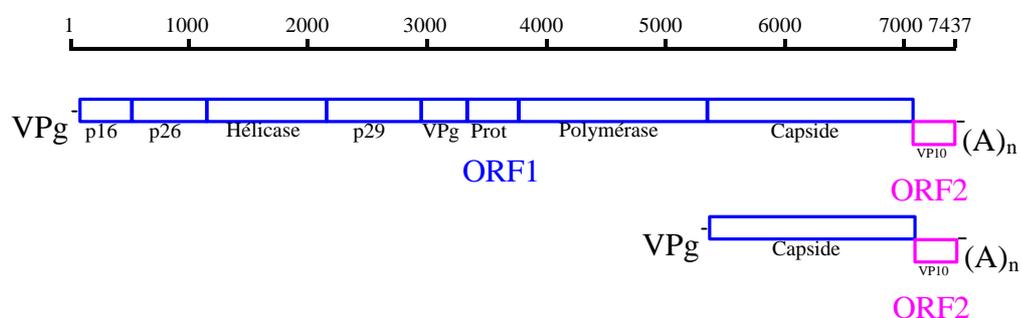


Figure 4 : Représentation schématique des ARN génomique et subgénomique du RHDV. La taille du génome en nucléotides est indiquée en haut du schéma.

Les virions du RHDV isolés de foies de lapins contaminés puis purifiés contiennent un ARN génomique de 7437 nucléotides et un ARN subgénomique de 2142 nucléotides. L'ARN

génomique contient 2 ORF (l'ORF1 et l'ORF2) et l'ARN subgénomique recouvre la fin de l'ARN génomique à partir du nucléotide 5296 et contient, ainsi, la fin de l'ORF1 codant pour la protéine de capsidite et l'ORF2 (Fig. 4). L'ORF1 s'étend du nucléotide 10 au nucléotide 7044 et l'ORF2 du nucléotide 7025 au nucléotide 7378 (Meyers *et al.*, 1991, Rasschaert *et al.*, 1995). Les 2 ARN génomique et subgénomique sont liés covalamment à une VPg de 15kDa par leur extrémité 5'. Deux régions non codantes sont conservées aux extrémités 5' et 3' des 2 ARN. Les longueurs de ces régions non codantes sont respectivement de 9 et 59 nucléotides (Meyers *et al.*, 1991). L'ORF1 code pour une polyprotéine de 257 kDa au sein de laquelle il a été identifié des protéines non structurales, une hélicase, la protéase 3C-like et l'ARN polymérase ARN dépendante, et des protéines structurales, la VPg et la protéine de capsidite (VP60). Cette polyprotéine porte 3 autres protéines dont les fonctions n'ont pas encore été identifiées.

2.3.5. Synthèse protéique et maturation

- La polyprotéine :

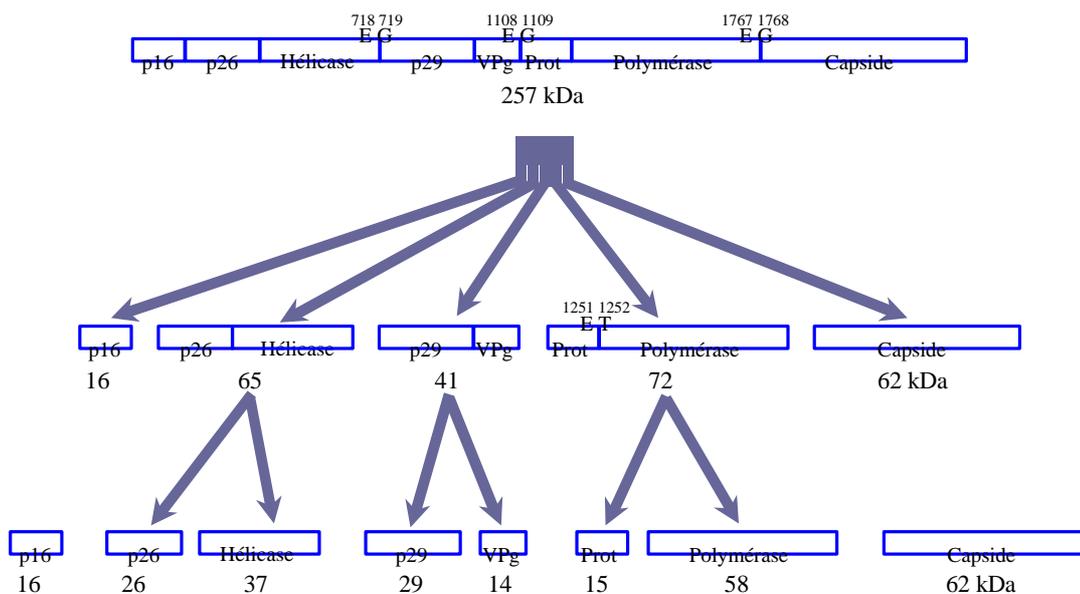


Figure 5 : Maturation de la polyprotéine du RHDV. En haut, représentation de la polyprotéine. En dessous, schématisation des événements de maturation décrits par König *et al.* (1998). Les sites de coupures identifiés et la masse moléculaire des produits de maturation sont indiqués sur le schéma.

Etant donné la difficulté de multiplier le virus RHDV en culture cellulaire, la plupart des études menées sur la maturation de la polyprotéine ont été réalisées en systèmes bactériens ou eucaryotes acellulaires. La maturation de la polyprotéine semble se dérouler selon un processus auto-catalytique impliquant la protéase 3C-like (Boniotti *et al.*, 1994). Il s'agit d'une protéase trypsine-like à cystéine dont la triade catalytique est définie par l'His-1135, l'Asp-1152 et la Cys-1212, la cystéine représentant le site nucléophile. En effet, sa substitution par une

sérine qui définit le site nucléophile des protéases trypsine-like n'abolit pas l'activité enzymatique. Différentes études, menées en système bactérien et/ou eucaryote acellulaire, ont permis de définir 4 sites de clivage spécifiques de la protéase 3C-like : E-G (718-719), E-G (1108-1109), E-T (1251-1252) et E-G (1767-1768) (Boniotti *et al.*, 1994, Martin Alonso *et al.*, 1996, Wirblich *et al.*, 1995). Il est important de noter que le clivage par la protéase 3C-like du site ET n'a pu être démontré dans un système eucaryote acellulaire (Wirblich *et al.*, 1996).

Par ailleurs, pour étudier la spécificité de clivage de la protéase 3C-like, une mutagenèse dirigée aux positions P2, P1 et P1' du site E-G (1108-1109) a été menée (Wirblich *et al.*, 1995). Cette analyse a montré que l'acide aminé situé en position P1 est le plus important pour le processus de clivage. Seuls les acides aminés ; acide glutamique (E), glutamine (Q) et acide aspartique (D) sont tolérés. A la position P1', de nombreux acides aminés sont tolérés mais avec une préférence marquée pour les acides aminés ; glycine (G), sérine (S), alanine (A). Pour la position P2, l'analyse indique une préférence pour les acides aminés hydrophobes ou avec un encombrement stérique important tels qu'une tyrosine (Y), une phénylalanine (F) ou une leucine (L). Plus récemment, pour vérifier les résultats obtenus *in vitro*, l'expression des protéines du virus RHDV dans les hépatocytes primaires de lapin a été analysée par marquage métabolique et immunoprécipitation (König *et al.*, 1998). Cette analyse a conduit à l'établissement d'une carte de la polyprotéine du RHDV (fig. 5). Le processus de maturation de la polyprotéine comprend au moins 2 étapes. Une 1^{ère} étape permet la libération de la protéine p16, de la protéine de capsid et de 3 intermédiaires de maturation (p65, p41 et p72). A cette étape, les sites E-G (718-719) et E-G (1108-1109) permettent la libération du précurseur p41, les sites E-G (1767-1768) et EG (1767-1768) la libération du précurseur p72. La deuxième étape conduit à libération de 6 protéines supplémentaires. Les auteurs ont proposé que le site ET (1251-1252), qui a été décrit dans un système d'étude bactérien comme faiblement clivé, pourrait correspondre au site permettant le passage du précurseur p72 à la libération de la protéase 3C-like et de l'ARN polymérase. En conclusion, la maturation de la polyprotéine mène à la libération d'au moins 8 protéines qui implique donc 7 sites de clivage. Actuellement, 3 sites de coupure restent encore non identifiés.

La protéine de capsid :

La protéine de capsid du RHDV a une taille de 62 kDa. La résolution de la structure tridimensionnelle du RHDV a permis de montrer que les particules virales étaient constituées d'un assemblage de 90 dimères (Thouvenin *et al.*, 1997). Le travail de thèse de Sylvie Laurent (Laurent *et al.*, 1997) a montré que les protéines de capsid forment des dimères maintenus par un pont disulfure établi à partir de l'unique cystéine (cys-291). De plus, le fait que la mutation de cette cystéine en arginine entraîne la perte de la capacité d'auto-assemblage de la capsid du RHDV suggère que les particules virales s'assemblent à partir de dimères préformés.

Par ailleurs, les analyses réalisées à l'aide de sérums polyclonaux anti-RHDV ont montré que la protéine de capsid était la cible majeure de la réponse humorale protectrice (Laurent *et al.*, 1994, Parra and Prieto 1990, Rodak *et al.*, 1990). De plus, la protéine de capsid exprimée en système baculovirus/cellules d'insectes (sf9) permet d'obtenir une grande quantité de pseudoparticules virales vides de tout acide nucléique et ayant les mêmes caractéristiques

morphologiques et immunologiques que les virions infectieux (Laurent *et al.*, 1997, Laurent *et al.*, 1994, Thouvenin *et al.*, 1997). Ces résultats ont suggéré le développement de vaccins recombinants anti-RHDV qui permettraient une alternative aux vaccins actuels qui requièrent l'utilisation d'animaux pour leur production. Un premier vaccin élaboré à partir de pseudoparticules virales inertes s'est révélé aussi efficace que les vaccins commercialisés (Laurent *et al.*, 1994). Un deuxième vaccin, constitué d'une souche virale de la myxomatose non virulente dans laquelle le gène de la capsid du RHDV a été introduit, administré par voie intradermique au lapin, protège à la fois contre la myxomatose et le RHDV (Bertagnoli *et al.*, 1996). Récemment, il a été produit des plantes transgéniques exprimant la protéine de capsid du RHDV dans le but de vacciner les lapins sauvages et fermiers par l'intermédiaire de la nourriture (Castañon *et al.*, 1999). Bien que l'injection sous cutanée d'extraits de ces plantes induise chez le lapin une protection efficace contre RHDV, il semble que le niveau d'expression de la protéine de capsid dans les plantes transgéniques soit insuffisant pour une vaccination par voie orale.

VP10 :

La VP10 est codée par l'ORF2 chez le RHDV. Il s'agit d'une petite protéine structurale de 10 kDa qui est présente en très faible quantité dans les particules virales (Wirblich *et al.*, 1996). De plus, le caractère basique de cette protéine suggère un rôle dans l'encapsidation du génome par une interaction avec la protéine de capsid et l'ARN viral. Par ailleurs, des recherches développées au laboratoire par Denis Rasschaert ont montré que la VP10 est produite par un nouveau mécanisme de couplage traductionnel. Selon ce mécanisme, 20% des ribosomes arrivant au codon stop de l'ORF1 ne se détacheraient pas et remonteraient jusqu'à l'ATG de l'ORF2 pour initier la traduction de la VP10.

3. LES PROTÉASES

3.1. Introduction

Précédemment, nous avons vu que les calicivirus sont des virus à ARN simple brin de polarité positive qui montrent dans leur stratégie de développement un passage obligé par la maturation d'une polyprotéine, celle-ci semblant être mise en œuvre par une seule et unique protéase d'origine virale. Les protéases jouent un rôle clé dans l'expression génomique de nombreux virus spécifiques d'hôtes eucaryotes. Il est en fait exceptionnel que le cycle de production d'un virus n'implique pas des événements de maturations protéolytiques. Une ou plusieurs protéases d'origine cellulaire ou virale sont nécessaires. Les protéases de l'hôte eucaryote ne sont pas le propos ici, la courte revue bibliographique a plutôt été focalisée sur les protéases virales qui prennent leur fonction dans le cytoplasme des cellules hôtes lors de la phase précoce du cycle productif mais aussi dans la phase tardive lors de la formation du virion.

Etant donné la vaste étendue du sujet nous avons limité notre étude aux protéases virales ayant pour rôle la maturation de la polyprotéine de 2 familles, historiquement très étudiées, de virus à ARN simple brin de polarité positive ; les *Picornaviridae* et les *Flaviviridae*.

3.2. Les différents types de protéase

Les protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse de la liaison peptidique entre les acides aminés. Elles ont des activités soit exoprotéasiques soit endoprotéasiques. Les exoprotéases dégradent les protéines par élimination progressive des acides aminés à partir de leur extrémité N-terminale ou C-terminale. Les endoprotéases, ou plus communément protéases, hydrolysent les protéines au niveau de sites internes spécifiques. La spécificité de la réaction est basée sur la nature des acides aminés de l'enzyme formant la poche catalytique et, donc, interagissant avec les acides aminés du substrat. Cette interaction peut conduire à une basse spécificité telle que pour la protéinase K où les acides aminés ne sont pas spécifiques mais doivent, en position P1, être de nature aliphatique, aromatique ou hydrophobe, ou à une très haute spécificité. Ainsi, la classification des protéases est définie par la nature des acides aminés qui forment la poche catalytique.

Les protéases à sérine:

Catalytic mechanism of serine proteinases

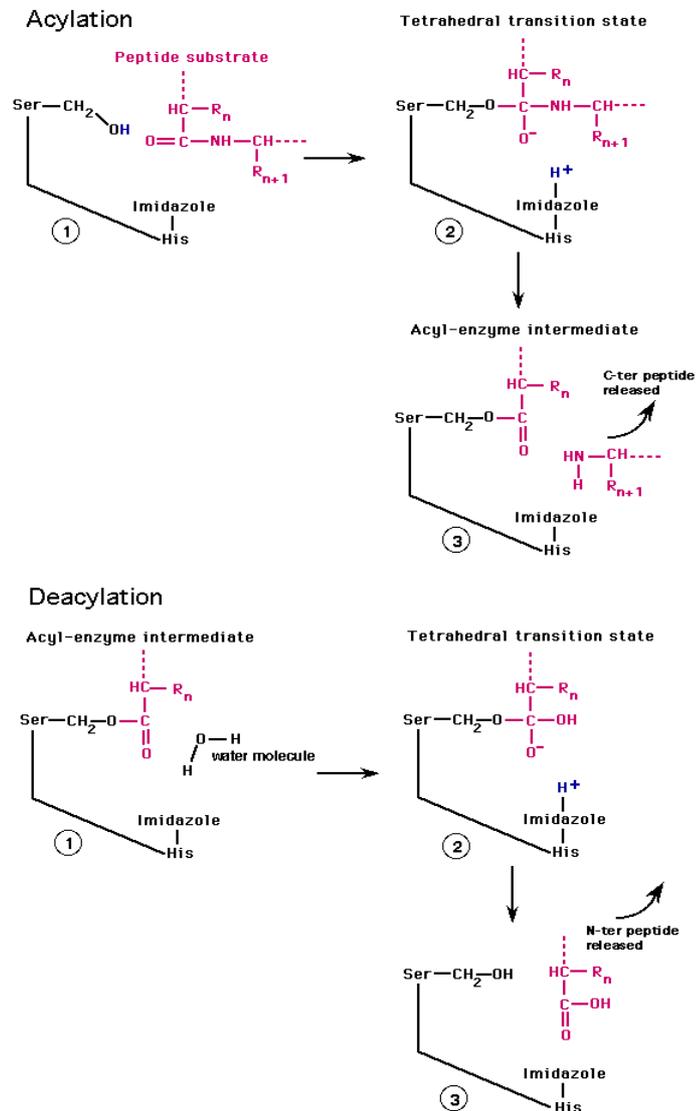


Figure 6 : Schéma explicatif du mécanisme moléculaire impliqué lors de l'hydrolyse protéique induite par les protéases à sérine (site internet : <http://delphi.phys.univ-tours.fr/Images/mecaser.gif>).

La classe des protéases à sérine est composée des protéases dont la triade catalytique est définie par les acides aminés histidine (H), acide glutamique (E) et sérine (S). Elle est divisée en 2 sous groupes : le sous groupe des protéases similaires à la trypsine et le sous groupe des protéases similaires à la subtilisine. La structure secondaire reflétée par la structure primaire ("trypsine"-H-E-S ; "subtilisine"-E-H-S) permet de différencier les 2 sous-groupes. Le mécanisme catalytique est le même dans les 2 cas (Fig. 6). Le groupement hydroxyl de la sérine agit comme un site nucléophile en initiant la formation de l'intermédiaire enzymatique acylé (Lesk and Fordham 1996, Steitz and Shulman 1982, Warshel *et al.*, 1989).

Les protéases à cystéine :

Les protéases à cystéine, nommées aussi thiol protéases, sont des protéases dont le mode de fonctionnement est analogue aux protéases à sérine. Leur triade catalytique est composée des acides aminés asparagine (N), histidine (H) et cystéine (C). Lors de l'hydrolyse protéolytique, le groupement soufré de la cystéine agit comme le site nucléophile en initiant l'attaque du groupement carboxyl du substrat. L'intermédiaire enzymatique acylé est formé par liaison entre les groupements carboxyl et soufré. Le groupement amide est protoné par le groupement imidazole de l'histidine. Enfin, le groupement carboxyl du substrat est hydrolysé entraînant la régénération du site actif de la protéase (Menard *et al.*, 1995, Vernet *et al.*, 1995).

Les aspartyl protéases :

Cette classe est composée de protéases dont le site catalytique est formé de 2 acides glutamiques (E). L'hydrolyse protéolytique procède d'une réaction acido-basique (Fig. 7). Contrairement aux 2 classes précédentes, le mécanisme de coupure protéolytique ne nécessite pas le passage par un intermédiaire enzymatique acylé (Pearl and Blundell 1984).

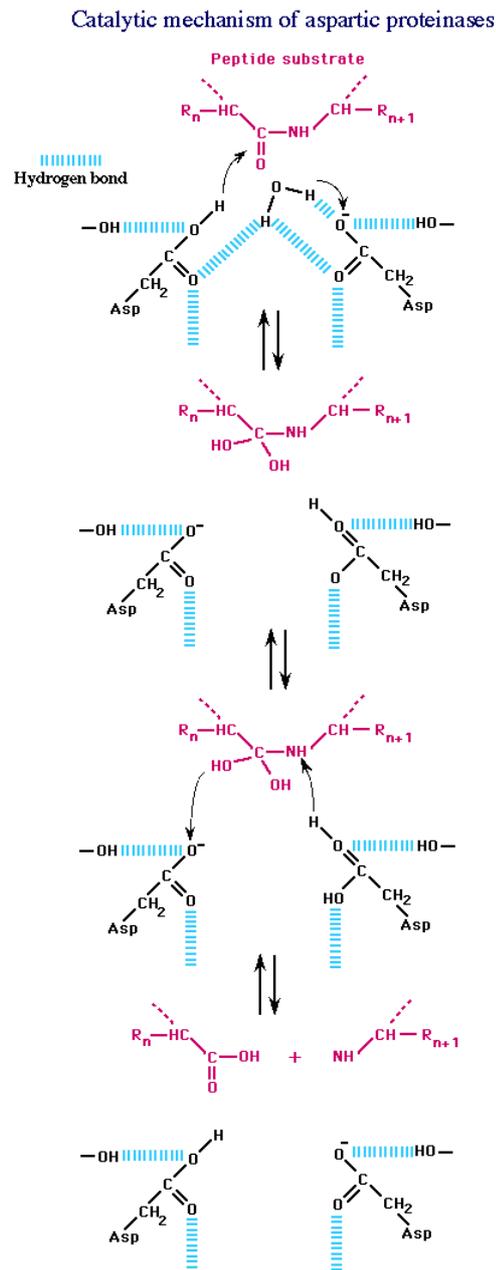


Figure 7 : Schéma explicatif du mécanisme moléculaire impliqué lors de l'hydrolyse protéolytique induite par les aspartyl protéases (site internet : <http://delphi.phys.univ-tours.fr/Images/mecaasp.gif>).

Les métallo-protéases :

Catalytic mechanism of metallo proteinases

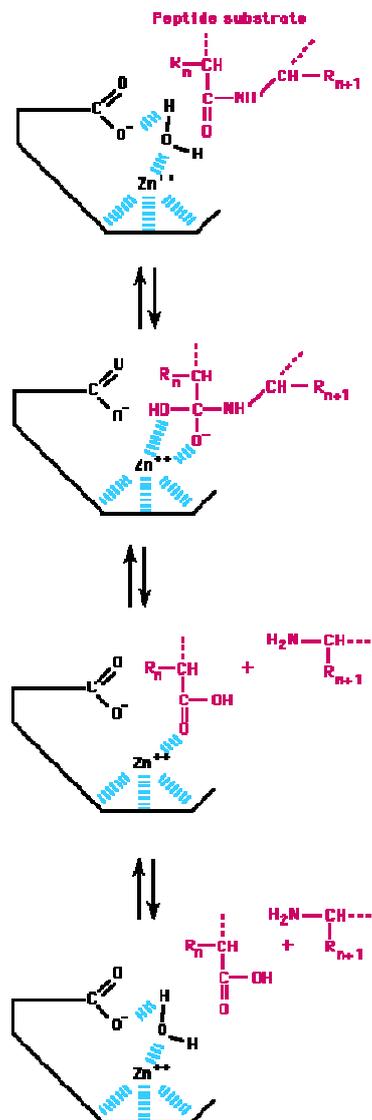


Figure 8 : Schéma explicatif du mécanisme moléculaire impliqué lors de l'hydrolyse protéolytique induite par les métallo-protéases (site internet : <http://delphi.phys.univ-tours.fr/Images/mecamet.gif>).

Les métallo-protéases présentent un ion divalent, souvent Zn^{2+} , au niveau du site catalytique (Fig. 8). Par ailleurs, au moins une histidine (H) et un acide glutamique (E) sont impliqués. L'histidine permet la coordination de l'ion métallique qui conduit à l'attaque nucléophile pendant laquelle l'acide glutamique a un rôle de donneur d'électron (Becker and Roth 1992).

3.3. Maturation de la polyprotéine des *Picornaviridae*

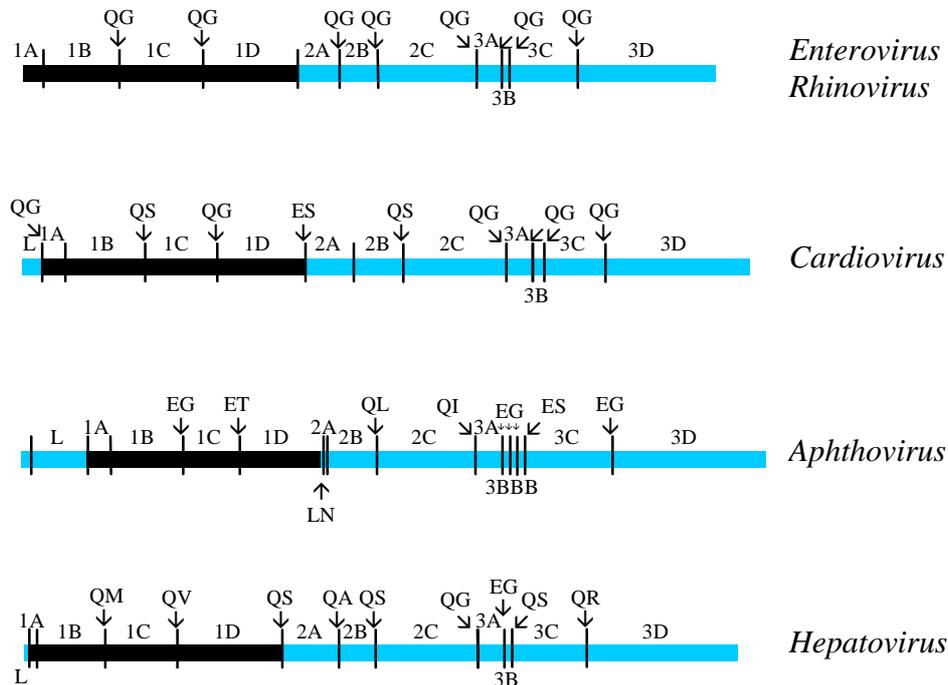


Figure 9 : Représentation schématique des polyprotéines des *Picornaviridae*. Les protéines non structurales sont représentées en bleu. Les sites identifiés et spécifiques de la protéase 3C sont indiqués au-dessus de chaque polyprotéine.

La famille des *Picornaviridae* est composée de virus non enveloppés à ARN simple brin de polarité positive. Le génome viral code pour une polyprotéine d'environ 230 kDa (Fig. 9). La maturation par clivages co-traductionnels ou post-traductionnels de la polyprotéine permet la libération des protéines virales indispensables au cycle productif des *Picornaviridae*. Le processus de maturation est entièrement réalisé par des protéases d'origine virale. Les *Picornaviridae* présentent 3 types de protéases à cystéine nommées protéase L, protéase 2A et protéase 3C qui peuvent être caractérisées par leur mécanisme protéolytique, leur spécificité de substrat et leur structure tridimensionnelle (Ryan and Flint 1997, Seipelt *et al.*, 1999).

Protéase L :

Les aphthovirus ont à l'extrémité N-terminale de leur polyprotéine une protéase (L) que l'on ne retrouve pas chez les membres des autres genres. Cette protéase présente un site catalytique composé de 2 acides aminés ; une cystéine et une histidine où la cystéine a le rôle de site nucléophile (Roberts and Belsham 1995). Par ailleurs, sa structure tertiaire a permis de l'intégrer dans le groupe des protéases papaïne-like à cystéine (Guarne *et al.*, 1998). La protéase L clive en *cis* la polyprotéine à la jonction L/1A dans un événement cotraductionnel (Piccone *et al.*, 1995). Le site spécifique de ce clivage semble se situer entre une lysine (K) et une glycine (G) (Seipelt *et al.*, 1999). Le génome des aphthovirus présente 2 codons AUG qui sont séparés par 84 nucléotides et qui permettent l'initiation de la synthèse de la polyprotéine. De ce fait, 2 espèces de protéines L, Lab et Lb suivant l'initiation au premier ou second AUG,

possédant la même activité protéolytique, ont été décrites dans les cellules infectées (Medina *et al.*, 1993).

Protéase 2A :

La protéine 2A est présente sur toutes les polyprotéines des *Picornaviridae* mais diffère de façon importante suivant le genre.

Entero/rhinovirus. La protéase 2A des entéro/rhinovirus clive la polyprotéine, au niveau d'un dipeptide Y-G, à la jonction 1D/2A, séparant le domaine P1 des protéines structurales des domaines P2 et P3 des protéines non structurales (Toyoda *et al.*, 1986). Cette protéase présente une triade catalytique composée d'une histidine (H), un acide aspartique (D) et une cystéine (C) avec la cystéine pour site nucléophile. L'étude de sa structure tertiaire a permis de l'apparenter aux protéases chymotrypsine-like à sérine (Bazan and Fletterick 1988, Seipelt *et al.*, 1999, Sommergruber *et al.*, 1997). Cependant, cette protéase présente comme originalité une structure, composé de 3 cystéines et d'une histidine, fixant un ion Zn^{2+} et permettant la stabilité de la forme active de l'enzyme (Sommergruber *et al.*, 1994, Sommergruber *et al.*, 1997).

Aphtho/cardiovirus. Chez les aphthovirus, la protéine 2A consiste en un domaine de 16 acides aminés. Cette courte séquence est capable de promouvoir le clivage cotraductionnel à sa propre extrémité C-terminale dissociant, ainsi, les précurseurs L-P1-2A et 2B-2C-P3 (Donnelly *et al.*, 1997, Ryan *et al.*, 1991).

Chez les cardiovirus, la protéine 2A a une taille d'environ 140 acides aminés. Elle ne présente aucune homologie de séquence avec la protéase 2A des entéro/rhinovirus. Cependant, elle est aussi capable de promouvoir le clivage de la polyprotéine dans un événement cotraductionnel à la jonction de 2A/2B au niveau d'un site G-P (Palmenberg *et al.*, 1992). Le motif DxExNPG constituant la jonction 2A/2B est conservé pour les virus des 2 genres et est nécessaire au clivage (Hahn and Palmenberg 1996).

Protéase 3C et maturation :

Comme nous venons de le voir, les protéases L et 2A participent ponctuellement à la maturation des polyprotéines des *Picornaviridae*. En fait, la protéase 3C est responsable de la majorité des événements de clivage. Les protéases 3C des 5 genres de la famille des *Picornaviridae* partagent 60% de similarité (Hall and Palmenberg 1996). L'alignement de séquences avec des protéases cellulaires et l'étude de la structure tertiaire de ces protéases 3C a permis de les apparenter aux protéases chymotrypsine-like à sérine (Allaire *et al.*, 1994, Gorbalenya *et al.*, 1989, Matthews *et al.*, 1994, Mosimann *et al.*, 1997). La triade catalytique est formée d'une histidine (H), d'un acide aspartique (D) (hépatovirus, cardiovirus et aphthovirus) ou d'un acide glutamique (E) (entéro et rhinovirus) et d'une cystéine (C), cette cystéine étant le site nucléophile (Gosert *et al.*, 1997, Grubman *et al.*, 1995, Hall and Palmenberg 1996, Kean *et al.*, 1993).

La maturation de la polyprotéine chez les picornavirus se fait de façon séquentielle. Précédemment, nous avons vu que les événements primaires de clivage font intervenir la protéase L dans le cas des aphthovirus, la protéase 2A dans le cas des entéro et rhinovirus mais aussi la protéine 2A dans le cas des cardiovirus et aphthovirus. De même, la protéase 3C

intervient dans l'étape primaire de maturation. En effet, quel que soit le genre, la protéase 3C permet par un processus cotraductionnel la libération du précurseur P3 mais aussi du précurseur P2 dans le cas particulier des hépatovirus (Jia *et al.*, 1993, Ryan and Flint 1997). Elle est aussi responsable des événements de maturation secondaires impliquant un processus post-traductionnel. Ces événements secondaires peuvent être régulés soit par une différence de spécificité de la protéase 3C suivant sa forme, soit par l'intervention d'un cofacteur dans le processus de clivage. Ainsi, chez le poliovirus, la protéase sous la forme du précurseur 3CD clive efficacement aux jonctions 1B/1C et 1C/1D alors que la protéase sous sa forme clivée (3C) est inefficace à la jonction 1C/1D (Jore *et al.*, 1988, Parsley *et al.*, 1999, Ypma-Wong *et al.*, 1988). Par ailleurs, l'intermédiaire 3AB agit comme un cofacteur viral auprès de la protéase. En effet, chez le poliovirus, il a été démontré que la molécule 3AB formait un complexe avec le précurseur 3CD stimulant le clivage à la jonction 3C/3D (Molla *et al.*, 1994). De même, chez le virus de l'hépatite A, il a été montré que le clivage tardif à la jonction 3A/3B (Probst *et al.*, 1998) permettait la stimulation du clivage au niveau des jonctions P1/2A, 2B/2C et 3C/3D par 3AB (Kusov and Gauss-Muller 1999). Chez le poliovirus, il a, aussi, été démontré l'intervention d'un cofacteur cellulaire lors de la maturation de l'intermédiaire P1 par 3CD (Blair *et al.*, 1993).

La spécificité de clivage lors de la maturation de la polyprotéine des picornavirus est établie par la nature des acides aminés constituant les sites de clivage. Dans le cas des entéro, rhino et cardiovirus, la spécificité de clivage de la protéase 3C est déterminée par un nombre restreint d'acides aminés ; en position P1 on retrouve une glutamine (Q) (acide aspartique -E- possible mais rarement) et en position P1' une glycine (G) (quelque fois une alanine -A- ou une sérine -S-). Par contre, dans le cas des aphtho et des hépatovirus, la nature des acides aminés au niveau des liaisons peptidiques induisant un clivage par la protéase 3C est plus variable; en position P1, on peut trouver une glutamine (Q), un acide glutamique (E) ou une leucine (L) et en position P1', une sérine (S), une glycine (G), une alanine (A), une méthionine (M), une leucine (L), une isoleucine (I), une valine (V), une thréonine (T), une asparagine (N) ou une arginine (R) (Hall and Palmenberg 1996, Palmenberg 1990).

L'infection par les picornavirus provoque une diminution drastique de la production des protéines cellulaires sans affecter celle de leurs propres protéines. En fait, les protéases virales, en plus de leur fonction dans la maturation de la polyprotéine, semblent impliquées dans la dégradation de protéines cellulaires ayant un rôle dans la transcription et la traduction. Ainsi, la protéase L des aphthovirus et la protéase 2A des entéro et des rhinovirus ont la capacité de cliver le facteur de traduction eIF-4G (Kirchweger *et al.*, 1994). De même, il a été démontré chez le poliovirus que la protéase 3C est capable de cliver le facteur de transcription TF-IIIC (Shen *et al.*, 1996).

3.4. Maturation de la polyprotéine des *Flaviviridae*

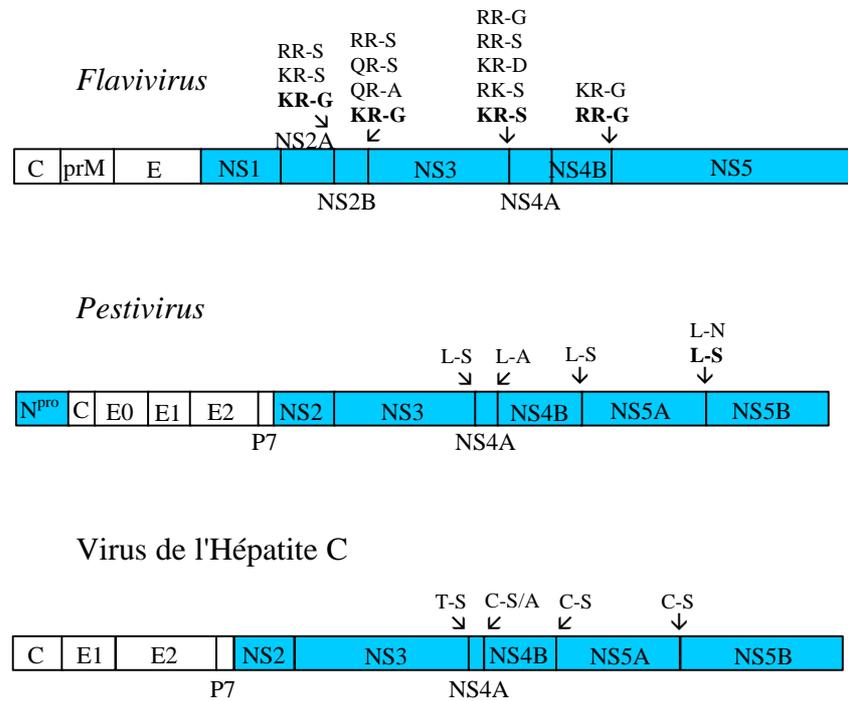


Figure 10 : Représentation schématique des polyprotéines des *Flaviviridae*. Les protéines non structurales sont représentées en bleu. Les sites identifiés et spécifiques de la protéase NS3 sont indiqués.

La famille des *Flaviviridae* est composée de virus enveloppés à ARN simple brin de polarité positive. Le génome viral présente une seule ORF codant pour une polyprotéine d'environ 300-400 kDa (Fig. 10). A l'exception de la protéine N^{pro} des pestivirus, les protéines structurales sont regroupées dans la région N-terminale de la polyprotéine et les protéines non structurales dans la région C-terminale. Les protéines structurales sont clivées par des protéases cellulaires (Falgout and Markoff 1995, Hijikata *et al.*, 1991, Nowak *et al.*, 1989) tandis que le clivage des protéines non structurales est essentiellement réalisé par la protéase virale portée par la région NS3. Cette région possède 3 domaines fonctionnels : les domaines hélicase et ATPase, situés en C-terminal, interviennent lors de la réplication du génome (Grassmann *et al.*, 1999, Takegami *et al.*, 1994, Wardell *et al.*, 1999) alors que le premier tiers de la protéine présente les acides aminés conservés H, D et S caractéristiques des protéases trypsine-like à sérine (Failla *et al.*, 1995, Gorbalenya *et al.*, 1989, Li *et al.*, 1999, Ryan *et al.*, 1998). Il faut noter que selon le genre, l'activité de la protéase NS3 se manifeste différemment.

Les Flavivirus :

La protéase à sérine NS3 est responsable du clivage de la polyprotéine aux jonctions NS2A/2B NS2B/3, NS3/4A et NS4B/5 (Cahour *et al.*, 1992, Falgout *et al.*, 1991, Lobigs 1992). La protéine NS3 est active sous la forme d'un complexe hétérodimérique avec NS2B. Un domaine hydrophile de 40 aa de la protéine NS2B a été déterminé comme indispensable à l'activité protéolytique de NS3 (Chambers *et al.*, 1993, Falgout *et al.*, 1993, Jan *et al.*, 1995). Les sites de maturation montrent aux positions P2 et P1 des acides aminés basiques (K, R ou Q) et à la position P1', un acide aminé avec un encombrement stérique faible (S, G et A) (Murthy *et al.*, 1999). Notons que le clivage en *cis* au site NS3/4A est d'efficacité plus faible que pour les autres sites et l'intermédiaire NS3-NS4A est présent dans les cellules infectées (Lin *et al.*, 1993, Lobigs 1992). L'efficacité plus ou moins importante à certains sites pourrait être, pour le virus, un moyen de réguler dans le temps la production de certaines protéines virales.

Le Virus de l'Hépatite C (HCV) :

La protéase à sérine NS3 clive à la jonction de NS3/4A, NS4A/4B, NS4B/5A et NS5A/5B. Le clivage entre NS3 et NS4A est un événement en *cis* (Bartenschlager *et al.*, 1994, Failla *et al.*, 1994) tandis que les autres clivages peuvent aussi être réalisés en *trans* (Tomei *et al.*, 1993). Il a aussi été établi que la protéase NS3 est nécessaire mais pas suffisante pour l'efficacité de coupure. En effet, en plus de NS3, NS4A est indispensable pour le clivage aux jonctions NS3/4A et NS4B/5A et augmente l'efficacité de coupure aux jonctions NS5A/5B et NS4A/4B (Bartenschlager *et al.*, 1994, Failla *et al.*, 1994). Le séquençage N-terminal des produits de maturation a permis de constater que l'acide aminé en position P1 est une cystéine (C) ou une thréonine (T) et l'acide aminé en P1' est une sérine (S) ou une alanine (A) (Grakoui *et al.*, 1993).

L'activité protéolytique entrant en jeu dans le clivage de la jonction NS2/3 ne semble pas nécessiter la triade catalytique de la protéase NS3. En effet, il semblerait que ce clivage impliquerait une triade classique présente dans la région C-terminale de la protéine NS2 et formée de 3 acides aminés ; une histidine (H), un acide glutamique (E) et une cystéine (C) (Grakoui *et al.*, 1993). De plus, il a été démontré que cette activité protéolytique exige l'intervention d'un ion divalent, Zn^{2+} , dont la coordination est dépendante de 3 cystéines présentes sur la région N-terminale de la protéase NS3 (Hijikata *et al.*, 1993, Wu *et al.*, 1998).

Les Pestivirus :

La protéase à sérine NS3 clive aux jonctions NS3/4A, NS4A/4B, NS4B/5A et NS5A/5B. La spécificité du clivage est déterminée en position P1 par une leucine (L) et en position P1' par une alanine (A), une sérine (S) ou une asparagine (N) (Tautz *et al.*, 1997, Xu *et al.*, 1997).

En plus de l'activité protéolytique de NS3, les pestivirus sont les seuls *Flaviviridae* qui présentent à l'extrémité N-terminale de la polyprotéine une activité autocatalytique. Cette activité est portée par la protéine N^{pro}. Il s'agirait d'une protéase à cystéine d'un nouveau genre avec un site catalytique composé d'une histidine et d'une cystéine (Rumenapf *et al.*, 1998). Elle induit le clivage à sa propre extrémité C-terminale au niveau d'un dipeptide C/S (Stark *et al.*, 1993).

4. CONTEXTE ET OBJECTIF DU TRAVAIL

Le RHDV est un calicivirus du genre *Lagovirus*. Non enveloppé, il présente un ARN simple brin de polarité positive de 7,5 kb pour génome. Cet ARN génomique possède 2 ORF : l'ORF1 qui code pour une polyprotéine de 257 kDa et l'ORF2 qui code pour la protéine structurale VP10.

Cette polyprotéine porte toutes les protéines virales nécessaires à la production du virus dans la cellule eucaryote. Notamment, elle contient les protéines structurales telles que l'hélicase, la protéase 3C-like et l'ARN polymérase ARN dépendante et, les protéines structurales telles que la VPg et la protéine de capsid (VP60). Ainsi, la maturation de la polyprotéine est un processus charnière dans le déroulement du cycle viral. La protéase 3C-like, qui est apparentée au groupe des chymotrypsine-like sérine protéases à cystéine, semble être la seule protéine virale impliquée dans le processus de maturation. Cette protéase 3C-like a une triade catalytique typique composée des acides aminés H-1135, D-1152 et C-1212.

Les études réalisées jusqu'alors ont permis de montrer que le processus de maturation du RHDV conduit à la libération de 8 protéines impliquant 7 sites de clivage protéolytique. Trois sites spécifiquement clivés par la protéase 3C-like ont été décrits dans un système eucaryote acellulaire : EG (718-719) à l'extrémité C-terminale de l'hélicase, EG (1108-1109) à l'extrémité N-terminale de la protéase 3C-like et EG (1767-1768) à l'extrémité N-terminale de la protéine de capsid (Boniotto *et al.*, 1994, Martin Alonso *et al.*, 1996, Wirblich *et al.*, 1995). En plus de ces 3 sites un 4^{ème} site a été décrit comme étant faiblement clivé par la protéase 3C-like en système bactérien (Wirblich *et al.*, 1996). Il s'agit du site ET (1251-1252) situé à l'extrémité C-terminale de la protéase 3C-like.

Dans ce contexte, les travaux de thèse ont été menés selon des axes bien précis :

- L'objectif prioritaire a été de déterminer les autres sites de clivage de la polyprotéine pouvant expliquer les protéines issues de la maturation.
- Il nous est apparu important d'étudier l'efficacité de coupure de la protéase du RHDV en fonction de sa forme (3C, 3CD ou autre), et ce pour 2 raisons essentielles : Vérifier que l'information protéique contenue entre les sites EG (1108-1109) et ET (1251-1252) possédait bien la fonction d'activité protéolytique. Justifier la présence dans les cellules infectées de l'intermédiaire stable de maturation 3CD (compris entre EG-1108 et EG-1767).
- Dans le but d'identifier de nouveaux sites potentiels, il a été réalisé l'étude de l'efficacité de coupure de la protéase 3C-like en *cis* sur de courtes séquences peptidiques, en *trans* sur des polypeptides prédéfinis.
- Enfin, nous avons procédé à la recherche d'éventuels cofacteurs viraux ou cellulaires pour l'expression de l'activité protéolytique de la protéase 3C-like. En effet, comme il a pu être observé dans le cas des flavivirus et des picornavirus, la protéase virale ne doit pas être le seul facteur intervenant dans le processus de maturation de la polyprotéine.

1. SOUCHES BACTÉRIENNES, SOUCHE VIRALE ET LIGNÉES CELLULAIRES

1.1. Souches bactériennes d'*Escherichia coli*

- La souche d'*E. coli* TG1 de génotype *SupE hsdΔ5 thi Δ(lac-proAB)/F' [traD36 proAB⁺ lac^f lacZΔM15]* a été utilisée dans toutes les étapes de clonage.
- La souche d'*E. coli* BL21 (DE3) de génotype *hsdS gal (λclts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gène 1)* a été utilisée pour l'expression des gènes clonés sous le promoteur T7.

1.2. Cellules de rein de lapin RK13

Les cellules de reins de lapin RK13 (ATCC CCL 37) sont utilisées pour la propagation du virus vTF7-3. Ces cellules sont multipliées en tapis à 37°C en milieu minimum essentiel de Earle (MEME, Gibco-BRL) supplémenté par 10% de sérum de veau foetal et additionné d'antibiotiques (100 u/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine). Lorsqu'elles sont à confluence, les cellules sont trypsinées (0,6 mg/ml de trypsine, 1,4 g/l de NaHCO₃ et 4 mM d'EDTA), centrifugées et ensemencées à une densité 3 fois inférieure.

1.3. Lignée cellulaire LMH

Cette lignée établie à partir de cellules épithéliales de carcinome hépatique (Kawaguchi *et al.*, 1987) s'entretient en culture de cellules comme les cellules RK13.

1.4. Virus de la vaccine T7 (vTF7-3)

Le virus de la vaccine T7 (Fuerst *et al.*, 1986) est un virus modifié par insertion dans son génome du gène de l'ARN polymérase ADN dépendante du phage T7. Il permet l'expression transitoire à un taux élevé de gènes clonés en amont du promoteur T7 en cellules de mammifères.

Production des inoculums viraux : un tapis de cellules RK13 à confluence a été infecté par la vaccine à une multiplicité d'infection (m. i.) de 5. Au bout d'une heure d'adsorption, le surnageant est remplacé par du milieu frais. Après 2 ou 3 jours, les cellules sont décollées par traitement avec 1/10^{ème} du volume de surnageant contenant 0,6 mg/ml de trypsine (DIFCO). Les cellules sont lysées par 3 cycles de congélation (-80°C)/décongélation. Le lysat cellulaire est clarifié par centrifugation à 1000g. Le surnageant est distribué en fractions aliquotes de 1 ml et est conservé à -20°C afin de servir d'inoculums pour les infections ultérieures.

2. ANTICORPS MONOCLONAUX ET SÉRUM POLYCLONAL

2.1. Anticorps monoclonal 3b5

L'Ac monoclonal 3b5 reconnaît spécifiquement un épitope linéaire (SSFFSYGEI) de la glycoprotéine S du TGEV (Virus de la gastro-entérite transmissible de porcelet) (Delmas *et al.*, 1990)

2.2. Sérum polyclonal anti-3D

La protéine 3D, présente sur la polyprotéine entre les sites ET et EG10 (§ 4.1.), correspond à l'ARN polymérase ARN dépendante du RHDV.

2.2.1. Préparation de l'antigène

On procède tout d'abord à la transformation par la construction pET3D (§ 6.3.) des bactéries *E. coli* BI21 (DE3) pLysS (Promega) par la technique du choc thermique.

Un μl de la construction pET3D (10ng/ μl) est ajouté à 30 μl de bactéries compétentes. Après incubation de 30 min dans la glace, le choc thermique est réalisé par un passage de 40 s à 42°C suivis de 2 min dans la glace. Après l'addition de 80 μl de milieu SOC (fourni par Promega), les bactéries sont régénérées par incubation sous agitation d'une heure à 37°C puis étalées sur milieu Luria-Bertani (LB) solide supplémenté en ampicilline (200 $\mu\text{g/ml}$).

Après 24h à 37°C, une colonie est repiquée dans 10 ml de milieu LB+ampicilline. Cette culture est mise sous agitation à 37°C jusqu'à ce que la DO à 600 nm atteigne 0,6. Alors, l'expression de la protéine 3D est induite par addition d'IPTG (1mM final) dans le milieu de culture. Après 3h30 d'incubation à 37°C, les bactéries sont lavées en Tris-HCl pH8 10mM. Après centrifugation, le culot bactérien est repris dans 1ml de Tris-HCl puis distribué en fractions aliquotes de 100 μl .

Une fraction aliquote est solubilisée par 20 μl tampon de charge 5X (β -mercaptoéthanol 5%, SDS 2%, glycérol 10% et Tris-HCl pH6,8 25 mM), portée à ébullition pendant 5 min puis déposée sur un gel de polyacrylamide SDS-PAGE à 10% en polyacrylamide. L'électrophorèse est réalisée en tampon Tris-Glycine (Tris-HCl pH7,4 25mM, Glycine 14,41 g/l et SDS 0,1%) sous ampérage constant (50 mA) (appareil mini-protean, Biorad). Les protéines sont colorées (tampon de coloration : éthanol 20%, acide acétique 10% et 4g/ μl de bleu de Coomassie) après décoloration du gel en tampon éthanol-acétate.

La bande à 57 kDa correspondant à la protéine 3D est découpée puis fragmentée dans 1 ml de tampon PBS (Phosphate Buffer Saline) avant d'être directement injectée au lapin.

2.2.2. Immunisation du lapin

L'antigène est injecté en plusieurs points sur le dos d'un lapin de 5 semaines. Un rappel d'immunisation est effectué 1 mois après la 1^{ère} injection. A partir du jour J0, un prélèvement sanguin à partir de la veine marginale de l'oreille du lapin est réalisé tous les 15 jours. Le sérum obtenu est testé par la technique de western blot. Le sérum correspondant au

prélèvement effectué 15 jours après la deuxième immunisation a été utilisé pour les tests d'immunoprécipitation.

2.3. Anticorps anti-VP60

L'Ac monoclonal anti-VP60 correspond à l'Ac E3 (Laurent *et al.*, 1997).

3. PLASMIDES

- Les plasmides pBS SK(-) (Stratagène) et pET22B(+) (Novagen) possèdent une région de sites multiples qui permet le clonage des gènes d'intérêt sous le promoteur T7.
- Le plasmide pGEM-T (Promega), qui sert de vecteur de stockage, permet le clonage direct des produits de PCR.
- Le plasmide pUGG10 est issu des banques d'ADNc du génome du RHDV-SD réalisées au laboratoire par clonage des inserts dans le site de restriction *SmaI* de pUC19 (Pharmacia). Il contient le génome complet de la souche virale RHDV-SD. Cette souche a été extraite du foie d'un lapin de garenne sauvage mort de la RHD en 1989 (Rasschaert *et al.*, 1995).
- Le plasmide pBSLucEco^r a été réalisé au laboratoire. Il renferme le gène de la luciférase muté de telle façon que le site *EcoRI* ait été remplacé par un site *BamHI* sans changement de la séquence peptidique.
- Le plasmide pET22B-Leader a été réalisé au laboratoire. Il s'agit du vecteur pET22B(+) digéré *NdeI-EcoRI* et comblé. Il permet le clonage au site *BamHI* des gènes d'intérêt sans le peptide leader.

4. SÉQUENCES

4.1. Séquence peptidique de la polyprotéine du RHDV

Séquence peptidique complète de la polyprotéine de 257 kDa du virus RHDV.

```

MAAMSRLTGM TTAILPEKKP LNFFLDLRDK TPPCCIRATG KLAWPVFLGQ YGKEG1PLETC 60
NKCGKWLNGF GCFGLEDLGD VCLCSIAQQK HKFGPVCLCN RAYIHDCGRW RRRSRFLKHY 120
KALNKVIPCA YQFDESFSTP VFE2EVDDLF VELGAPSMG FMDKLLKKG KKLMDKFVDV 180
DEPCLTSRDA SLLDSIASDN TIRAKWEEY GVEMVQAARD RKDFMKNLRL ALDNRPANPV 240
TWYTKLGNIT EKKGQWAKKV VYGACKVTDP LKTLASILLV GLHNVIADVT TVMLSTFKPV 300
NLLAILMDWT NDLTGFVTTL VRLLELYGVV QATVNLIVE3 VKSFWDKVVC ATDRCFDLLK 360
RLFDTFEDSV PTGPTAGCLI FMAFVFSTVV GYLPNNSVIT TFMKGAGKLT TFAGVIGAIR 420
TLWITINQHM VAKDLTSIQQ KVMTVVKMAN EAATLDQLEI VSCLCSDLEN TLTNRCTLPS 480
YNQHLGILNA SQKVISDLHT MVLGKINMTK QRPQPVAVIF KGAPGIGKTY LVHRIARDLG 540
CQHPSTINFG LDHFDSYTGE EVAIADEFNT CGDGESWVEL FIQMVNTNPC PLNCDKAENK 600
NKVFNSKYLL CTTNSNMILN ATHPRAGAFY RRVMIVEARN KAVESWQATR HGSKPGRSCY 660
SKDMSHLTFQ VYPHNPAPG FVFVGDKLVK SQVAPREYKY SELLDLIKSE HPDVASFEG4A 720
NRFNFVYPDA QYDQALLMWK QYFVMYGCVA RLAKNFVDDI PYNQVHISRA SDPKIE5CVE 780
YQCKFQHLWR MVPQFVLGCV NMTNQLGTPL TQQQLDRVTN GVEG6VTVTTV NNILPFHSQT 840
TLINPSFIKL IWAVRKHLKG LSGVTKVAQF IWRVMTNPVD AYGSLVRTLT GAATFSDDPV 900
STTIICSNCT IQIHSCGGLL VRYSRDPVPV ASDNVDRGDQ G1VDVFTDPNL ISGFSWRQIA 960
HLFVEVISRL CANHLVNLAT MAALGAVATK AFQ7G2VKGGTK RRGARVNLG NDEYDEWQAA 1020
RREFVNAHDM TAEEYLAMKN KAAMGSDDQD SVMFRSWWTR RQLRPDEDQV TIVGRGGVRN 1080
EVIRTRVRQT PKGPKTLDDG GFYDNDYEG8L PGFMRHNGSG WMIHIGNGLY ISNTHTARSS 1140
CSEVVTCSPT TDLCLVKGEA IRSVAQIAEG9 TPVCDWKKSP ISTYGIKCTL SDSTKIDVLA 1200
YDGCTQTTHG DCGLPLYDSS GKIVAIHTGK LLGFSKMCTL IDLTITKGVY ETSNFCGEP 1260
IDYRGITAHR LVGAEPRPV STRYAKVPG VPEEYKGYR PANLGRSDPD SDKSLMNIAV 1320
KNLQVYQQEP KLDKVDEFIE RAAADVLGYL RFLTKGERQV NLNFKAAFNT LDLSTSCGPF 1380
VPGKKIDHVK DGVMDQVLAK HLYKCWSVAN SGKALHHIYA CGLKDELRPL DKVKE3KKRL 1440
LWGCDVGVAV CAAAVFHNIC YKLKMVARFG PIAVGVDMTS RDVDVIINNL TSKASDFLCL 1500
DYSKWSTMS PCVVRLAIDI LADCCEQTEL TKSVVLTLSKS HPMTILDAMI VQTKRGLPSG 1560
MPFTSVINSI CHWLLWSAAV YKSCAEIGLH CSNLYEDAPF YTYGDDGVYA MTPMMVSLLP 1620
AIIENLRDYG LLPTAADKTE FIDVCPLNKI SFLKRTFELT DIGWISKLDK SSILRQLEWS 1680
KTTSRHMMIE ETYDLAKEER GVQLEELQVA AAAGQEFFN FVRKELERQO AYTQFSVYSY 1740
DAARKILADR KRVSVVPDD EFVNVMEG10KA RTAPQGEAAG TATTASVPGT TTDGMDPGVV1800
ATTSVVTAEN SSASIATAGI GGPPQQVDQQ ETWRTNFYYN DVFTWSVADA PGSILYTVQH 1860
SPQNNPFTAV LSQMYAGWAG GMQFRFIVAG SGVFGGRLVA AVIPPGIEIG PGLEVRQFPH 1920
VVIDARSLEP VTITMPDLRP NMYHPTGDPG LVPTLVLSVY NNLINPFGGS TSAIQTVTET 1980
RPSEDFEFVM IRAPSSKTVD SISPAGLLTT PVLTGVGNDN RWNGQIVGLQ PVPGGFSTCN 2040
RHWNLNGSTY GWSSPRFADI DHRGSASYP GNNATNVLQF WYANAGSAID NPISQVAPDG 2100
FPDMSFVPFN GPGIPAAGWV GFGAIWNSNS GAPNVTTVQA YELGFATGAP GNLQPTTNTS 2160
GSQTVAKSIY AVVTGTAQNP AGLFVMASGV ISTPSANAIT YTPQPDRIVT TPGTPAAAPV 2220
GKNTPIMFAS VRRTGDVNA TAGSANGTQY GRGSQPLPVT IGLSLNNYSS ALMPGQFFVW 2280
QLTFASGFME IGLSVDGYFY AGTGASTTLI DLIELIDVRP VGPRPSKSTL VFNLGGTANG 2340
FSYV. 2345

```

Figure 11 : Séquence peptidique de la polyprotéine du RHDV. Les différents dipeptides étudiés sont représentés en gras et les acides aminés environnants en rose. Les acides aminés apparaissant en rouge forment le site catalytique de la protéase 3C-like. La méthionine correspondant aux initiations internes dans les constructions pEG-3CY est soulignée.

4.2. Séquences des différents oligonucléotides

La séquence des oligonucléotides utilisés dans les différentes expériences de PCR (Polymerase Chain Reaction) réalisées au cours de la thèse est donnée tableau 2.

Tableau 2 : Séquence et localisation des oligonucléotides

N°	Séquences	Orientation/ Localisation
14	tctaga <u>agatct</u> TTTATAGCTTACTTTAAACT <i>Bgl</i> II	inverse -2345
18	tctaga <u>agatct</u> ATGGAGGGCAAAGCCCCGAC <i>Bgl</i> II	direct 1766-
35	tctaga <u>ggatcc</u> atg GAGGGCCTGCCTGGGTTCC <i>Bam</i> HI	direct 1108-
35b	tctaga <u>ctcgag</u> at <u>ccatg</u> GAGGGCCTGCCTGGGTTCC <i>Xho</i> I <i>Nco</i> I	
50	agatct <u>gaattc</u> tta CAATTTGGACTTTCCGCC <i>Eco</i> RI	inverse fin du gène de la luciférase
108	gagctc <u>aagctt</u> <u>tctaga</u> <u>gctagc</u> TTTCACCTTGTCAGAGGCCTGAG <i>Hind</i> III <i>Xba</i> I <i>Nhe</i> I	
123	<u>gatac</u> <u>gaattc</u> <u>gtcgac</u> GCCAAAAACATAAAGAAAGGC <i>Eco</i> RI <i>Sal</i> I	direct début du gène de la luciférase
211	tctaga <u>gaattc</u> tca GCTGGAGTCATACAACGGCA <i>Eco</i> RI	inverse -1217
212	tctaga <u>gaattc</u> tca TGTTTCATAAACTCCCTTTG <i>Eco</i> RI	inverse -1254
213	tctaga <u>gaattc</u> tca GAAGCGTAAGTATCCCAAGA <i>Eco</i> RI	inverse -1356
353	tctaga <u>attaat</u> atg GGAGTTTATGAAACATCAAAC <i>Vsp</i> I	direct 1248-
354	tctaga <u>ggatcc</u> tta <u>ctcgag</u> AACATTACAAAACCTCGTCGT <i>Bam</i> HI <i>Xho</i> I	inverse -1765
355	tctaga <u>catatg</u> GAGGGCCTGCCTGGGTTCC <i>Nde</i> I	direct 1108-
356	tctaga <u>gaattc</u> tca <u>ctcgag</u> TGTTTCATAAACTCCCTTTG <i>Eco</i> RI <i>Xho</i> I	inverse -1252
357	tctaga <u>catatg</u> GCGGCTATGTGCGCCTTACTG <i>Nde</i> I	direct 1-
358	tctaga <u>gaattc</u> tca <u>ctcgag</u> CCCCTCAAAAACAGGGGTGGAG <i>Eco</i> RI <i>Xho</i> I	inverse -144
372	tctaga <u>ccatgg</u> AGGGCCTGCCTGGGTTCC <i>Nco</i> I	direct 1108-
373	tctaga <u>gctagc</u> TGATGTTTCATAAACTCCCTTTGTG <i>Nhe</i> I	inverse -1252
420	tctaga <u>gaattc</u> atg GGGGAGGTTGACGACTTGTTTG <i>Eco</i> RI	direct 144-
459	tctaga <u>gtcgac</u> tca CTCATAGTCATTGTCATAAAAAGCCACCA <i>Sal</i> I	inverse -1108
461	tctaga <u>gtcgac</u> tca CTCAAATGAGGCCACGTGCG <i>Sal</i> I	inverse -718
462	tctaga <u>gaattc</u> atg GGTGCCAACAGATTCAACTTTG <i>Eco</i> RI	direct 719-
495	tctaga <u>gtcgac</u> <u>ggatcc</u> <u>atgcat</u> TTCACCTTGTCAGAGGCC <i>Sal</i> I <i>Bam</i> HI <i>Nsi</i> I	inverse -1434
496	ccc <u>tctaga</u> <u>gtcgac</u> <u>gaattc</u> GTCAACCTCNNNNNAAAAACAGGG <u>ttgca</u> <i>Xba</i> I <i>Sal</i> I <i>Eco</i> RI <i>Nsi</i> I muté	
507	atg <u>gaattc</u> <u>gatac</u> CCTTCGAGCTTTTTTCAGTTACGGTGAAATTCCT <u>ctcgag</u> <u>agatct</u> <u>tctaga</u> tga <i>Eco</i> RI <i>Eco</i> RI <i>Xho</i> I <i>Bgl</i> II <i>Xba</i> I	
508	atgcat ATGGAATTCGATATCCCT	direct
509	ccatgg TCATCTAGAAGATCTCTC	inverse

515	ggatcc <u>gaattc</u> ATGGCGGCTATGTCGC <i>EcoR</i> I	direct 1-
516bis	ggatcc <u>gata</u> tc GGGTTTGAACGTTGACAAC <i>EcoR</i> V	inverse -299
515bis	ggatcc <u>agat</u> ct ATGGCGGCTATGTCGC <i>Bgl</i> II	direct 1-
516	ggatcc <u>tcta</u> ga GGGTTTGAACGTTGACAAC <i>Xba</i> I	inverse -299
517	ggatcc <u>gaattc</u> TTGACATCAAGAGACGCC <i>EcoR</i> I	direct 184-
518bis	ggatcc <u>gata</u> tc TGTGCACAGCAAGTACTTTG <i>EcoR</i> V	inverse -612
517bis	ggatcc <u>agat</u> ct TTGACATCAAGAGACGCC <i>Bgl</i> II	direct 184-
518	ggatcc <u>tcta</u> ga TGTGCACAGCAAGTACTTTG <i>Xba</i> I	inverse -612
519	ggatcc <u>gaattc</u> GTTATAAGTGACTTACACAC <i>EcoR</i> I	direct 494-
520bis	ggatcc <u>gata</u> tc CCTGGTGCGGATGACC <i>EcoR</i> V	inverse -1088
519bis	ggatcc <u>agat</u> ct GTTATAAGTGACTTACACAC <i>Bgl</i> II	direct 494-
520	ggatcc <u>tcta</u> ga CCTGGTGCGGATGACC <i>Xba</i> I	inverse -1088
521	ggatcc <u>gaattc</u> TGGCGTGTCATGACCAAC <i>EcoR</i> I	direct 872-
522bis	ggatcc <u>gata</u> tc CCTGGTGCGGATGACC <i>EcoR</i> V	inverse -1394
521bis	ggatcc <u>agat</u> ct TGGCGTGTCATGACCAAC <i>Bgl</i> II	direct 872-
522	ggatcc <u>tcta</u> ga CCTGGTGCGGATGACC <i>Xba</i> I	inverse -1394
523	ggatcc <u>gaattc</u> AGGCTAGCCATTGACATC <i>EcoR</i> I	direct 1515-
524bis	ggatcc <u>gata</u> tc CTTACCCACAGGTGCAG <i>EcoR</i> V	inverse -2222
626	CAGCC <u>agat</u> ctCACCGTGGGTGGTCTG <i>Bgl</i> II	inverse -1214
627	GGTG <u>agat</u> ctGGCTGCCGTTGTATGACTCCA <i>Bgl</i> II	direct 1210-
628	tctaga <u>gtc</u> gac GCGGGCTTTGCCCTCCATAACG <i>Sal</i> I	inverse

La séquence des oligonucléotides phosphorylés en 5' utilisés pour l'élaboration des constructions pBPL et pEG-3CY est indiquée tableau 3.

Tableau 3 : Séquences des oligonucléotides phosphorylés en 5' et hybridés 2 à 2

Sites	N°	Séquences
EG1	177	ctagttacgaaaagaaggacctctggagg
	178	aatgccttttcttctctggagacctccagct
EG2	179	ctagtcctgtttttgagggggaggttgacg
	180	aggacaaaaactccccctccaactgcagct
EG3	181	ctagtcctgatcgttgaggggtgtgaagagtg
	182	agactagcaactcccacacttctccacagct
EG4	183	ctagtgccctcatttgaggggtgccaacagag
	184	acggagtaaactcccacggttgtctcagct
EG5	185	ctagtcctcctcatttgaggggtgccaacagag
	186	aggtttctaacttcccacacacctccagct
EG6	187	ctagtaacggggtcgagggagtcactgtcg
	188	attgcccagctccctcagtgacagcagct
EG7	189	ctagtaatgactatgagggcctgcctgggg
	190	attactgatactcccggacggaccccagct
EG8	191	ctagtcagatcgctgaggggtaccccagtcg
	192	agtctagcgaactcccattgggggtcagcagct
EG9	132	ctagtaaggtgaaagaaggcaagaagcgcg
	133	attccactttcttccgttcttccgagct
EG10	130	ctagtaacgttatggagggcaaagcccgcg
	131	attgcaataactcccgtttcggggcgcagct
ET	207	ctagtgagtttatgaaacatcaaacttcg
	208	acctcaaatactttgtagtttgaagcagct
QG	193	ctagtaacgttatgcaaggcaaagcccgcg
	194	attgcaatacgttccgtttcggggcgcagct
11	197	ctagtaacgttatgaaagcccgcg
	198	attgcaatactttcggggcgcagct
QG1	454	ctagtcgcggtgaccaaggtgttgacgtgg
	453	agcgccactggttccacaactgcaccagct
QG2	455	ctagtaaagcttttcagggcgtgaaaggcg
	456	atttcgaaaagtcccgcactttccgcagct

4.3. Séquence de la construction pBPL10

CACCTGACGCGCCCTGTAGCGCGCATTAAAGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGC 80
GCCCTAGCGCCCTCCTTTTCGCTTTCTCCCTTCTTCGCGCAGTTCCGCGGCTTCCCGTCAAGCTCTAAATCG 160
GGGGTCCCTTAGGTTCCGATTTAGTGTCTTACGCGACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTA 240
GTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTGTTCCAA 320
ACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTTATAAGGGATTTTCCGATTTCCGCCTATTTGGTTAAA 400
AAATGAGCTGATTTAAACAAAAATTTAACGGAATTTAACAAAAATTTAACGCTTACAATTTCCATTCCGCTTCCAGGCT 480
GCGCAACTGTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGC 560
GATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTACGACGTTGTAACACGCGCCAGTGAATTTGTAATACGACTCACTA 640
TAGGGCAATTTGGGTACCGGGCCCCCTCGAGATccatgaggGGGCTGCCTGGGTTTCATGAGACACAATGGCAGTGGCT 720
M E G L P G F M R H N G S G
GGATGATCCACATAGTAACGGGCTGTACATCTCCAACACTCATACCGCCAGGTCAAGTTGCTCAGAAGTTGTCACATGC 800
W M I H I G N G L Y I S N T H T A R S S C S E V V T C
TCACCTACCACTGACCTGTGCCTCGTCAAGGGTGAAGCAATCCGCAGTGTGCTCAGATCGCTGAGGGTACCCAGTCTG 880
S P T T D L C L V K G E A I R S V A Q I A E G T P V C
CGACTGGAAGAAGTCCCAATTTCCGACCTATGGCATCAAGAAGACATTGTCCAGACTCCACAAAAGATTGACGTGCTGGCGT 960
D W K K S P I S T Y G I K K T L S D S T K I D V L A
ACGACGGGTGCACGACAGACCACCCACGGTACTGTGGGCTGCCGTTGTATGACTCCAGCGGAAAAGATTGTTGCCATCCAC 1040
Y D G C T Q T T H G D C G L P L Y D S S G K I V A I H
ACTGGAAGCTGTTGGGGTTTTCAAAGATGTGCACGTTGATTGACCTCACCATCACAAAAGGGAGTTTATGAAACATCAAAA 1120
T T G L L G F S K M C T L I D L T I T K G V Y E T S N
CTTCTTCTGCGCGCAATTTGACTATAGAGGCATCACCGCACACAGGCTCGTCCGCGCGGAACCCAGACTCCCGTTA 1200
F F C G E P I D Y R G I T A H R L V G A E P R P P V
GTGGAACAGGTATGTAAGTCCCAGGTGTTCTGAAGAGTATAAGACTGGGTACAGACCAGCCACCTTGGGGCGCAGT 1280
S G T R Y A K V P G V P E E Y K T G Y R P A N L G R S
GACCCAGACAGTACAAGTCACTCATGAACATTGCGGTGAAAACTTACAGGTGTACCAGCAAGAACCAAGCTCGGATAA 1360
D P D S D K S L M N I A V K N L Q V Y Q Q E P K L D K
GGTGGATGAGTTTATCGAGCGAGCGGCTGCCGACGTTTGGGATACCTACGCTTCCCTAACCAAGGGGGAGCGCCAGGTAA 1440
V D E F I E R A A A D V L G Y L R F L T K G E R Q V
ACCTAAACTTTAAAGCCGATTAATACCCTAGACCTGTCAACCTCTTGGGGCCCTTTGTTCCAGGAAGAAGATTGAC 1520
N L N F K A F N T L D L S T S C G P F V P G K I D
CATGTGAAAGACGGGTGATGGACCAAGTCTAGCCACCTTTACAAGTGTGGAGTGTGCCAATTTGGTAAAGC 1600
H V K D G V M D Q V L A K H L Y K C W S V A N S G K A
CCTTACCACATATACGCGTGTGGTTGAAGGACGAGCTCAGGCCCTTTGACAAGGTGAAAGAGgttagactctagaagc 1680
L H H I Y A C G L K D E L R P L D K V K E A S S R K
ttgatactgaattcgtgacGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCCATTCTATCTCTAGAGGATGGAACCCGCTGGA 1760
L D I E F V D A K N I K K G P A P F Y P L E D G T A G
GAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCTTGGAAACAATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGAA 1840
E Q L H K A M K R Y A L V P G T I A F T D A H I E V N
CATCACGTACGCGGAATACTTCGAAATGTCGGTTCGGTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACA 1920
I T Y A E Y F E M S V R L A E A M K R Y G L N T N H
GAATCGTGTATGACGAGTAAAACCTCTCTTCAATTTTATGCCGTTGGGCGGTTATTATCGGAGTTGACGTTGGC 2000
R I V V C S E N S L Q F F M P V L G A L F I G V A V A
CCCGGAACGACATTTATAATGAACGTGAATTTGCTCAACAGTATGAACATTTCCGACGCTACCGTAGTGTGTTTCCAA 2080
P A N D I Y N R E R E L L N S M N I S Q P T V V F S K
AAAGGGTTGCAAAAAATTTGAACGTGCAAAAAAATTTACCAATCCAGAAAATTTATCATGGATTCTAAAACG 2160
K G L Q K I L N V Q K K L P I I Q K I I I M D S K T
ATTACCAGGATTTACGTCGATGTACACGTTGTCACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAATGAATACGATTTGTACCA 2240
D Y Q G F Q S M Y T F V T S H L P P G F N E Y D F V P
GAGTCTTTGATCGTACAAAATTTGCACTGATAATGAACCTCTGGATCCACTGGGTTACCTAAGGGTGTGGCCCT 2320
E S F D R T K I A L I M N S S G S T G L P K G L T
TCCGCATAGAAGTCCGCTGCGTCAGATTCTCGCATGCCAGAGATCTATTTTTGGCAATCAAATCATTCGGGATACTGCGA 2400
P H R T A C V R F S H A R D P I F G N Q I I P D T A
TTTTAAGTGTGTTCCATTCCATCAGGTTTTTGGAAATGTTTACTACACTCGGATATTTGATATGTGGATTTCCGAGTCCGTC 2480
I L S V V P F H H G F G M F T T L G Y L I C G F R V V
TTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTTTACGATCCCTTACGATTACAAAATCAAAGTCCGTTGCTAGTACCAAC 2560
L M Y R F E E E L F L R S L Q D Y K I Q S A L L V P T
CCTATTTTCAATTTCCGCAAAAGCACTCTGATTGACAAAATACGATTTATCTAATTTACACGAAAATGCTTCTGGGGGCG 2640
L F S F F A K S T L I D K Y D L S N L H E I A S G G
CACCTCTTTGAAAGAAAGTCCGGGAAGCGTTGCAAAACGTTTCCATCTTCCAGGGATACGACAAGGATATGGGCTCACT 2720
A P L S K E A V G E A V A K R F H L P G I R Q G Y G L T
GAGACTACATCAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGGATGATAAACCGGGCGGTCGGTAAAGTTGTTCCATTTTTTGA 2800
E T T S A I L I T P E G D D K P G A V G K V V P F F E
AGCGAAGTTGTGGATCTGGATACCGGGAACCGTGGGCGTTAATCAGAGAGGGCAATTATGTGTGAGAGACCTATGA 2880
A K V L D T G D L G V N Q R G E L C V R G P M
TTATGTCGGTTATGTAAACAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGGCTACATTCTGGAGACATA 2960
I M S G Y V N N P E A T N A L I D K D G W L H S G D I
GCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCATAGTTGACCGCTTGAGTCTTTAATTAATAACAAAGGATATCAGGTGGC 3040
A Y W D E D E H F F I V D R L K S L I K Y K G Y Q V A
CCCCGTGAATTTGGAATCGATTTTACAAACCCCAACTTTCGACGCGGGCGTGGCAGGCTTCCCGACGATGACG 3120
P A E L E S I L L Q H P N I F D A G V A G L P D D D
CCGGTGAACCTCCCGCCCGTGTGTTTTGGAGCACGGAAGACGATGACGGAAAAAGAGATCGTGGATTACGTCGCC 3200

```

A G E L P A A V V V L E H G K T M T E K E I V D Y V A
AGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTGCGCGGAGGAGTTGTGTTTTGTGGACGAAGTACCGAAAGTCTTACCGAAAACT 3280
S Q V T T A K K L R G G V V F V D E V P K G L T G K L
CGACGCAAGAAAAATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGTCCAAATTGTAAgaattcctGCAGCCCG 3360
D A R K I R E I L I K A K K G G K S K L .
GGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCCCACCGCGGTGGAGCTCCAGCTTTTGTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTTTCGAG 3440
CTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCCTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTCACAATTCACACACAACATACGAGCCGGAA 3520
GCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCCAG 3600
TCGGGAAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACCGCGGGGAGAGGGGTTTGGCTATTGGGCGCTCTTC 3680
CGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTCGCTCGGTTCGGTTCGGGTCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATAC 3760
GGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCGAGAAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAG 3840
GCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCG 3920
AAACCCGACAGGACTATAAAGATACAGGCGTTTCCCCCTGGAAGTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCCTGCCGC 4000
TTACCGGATACCTGTCCGCTTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTTCG 4080
GTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCAGAACCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCGGTAACACT 4160
TCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGT 4240
ATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAGGACAGTATTGGTATCTGGCGCT 4320
CTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTT 4400
TTTTATTCCAGAGCAGAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATTCAGAAAGATCCTTTGATCTTTTTCACGGGCTGTACG 4480
CTCAGTGGAAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAAT 4560
TAAAAATGAAGTTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGC 4640
ACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCGCTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGG 4720
GCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACACG 4800
CCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCGGGGAAGC 4880
TAGAGTAAGTAGTTCCGCGAGTTAATAGTTTGGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTG 4960
TTGGTATGGCTTCAATTCAGCTCCGGTTCCTAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTT 5040
AGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGCAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAA 5120
TTCTCTTACTGTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGA 5200
TGCGCGCAGCAGTTGCTCTTGGCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATC 5280
ATTGGAAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCGATGTAACCCACTCGTGC 5360
ACCCAACCTGATCTTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAA 5440
AGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTGAATACTCATACTCTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTACAGGGTTATT 5520
TGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGGAAAAAGT 5600
GC 5602

```

Figure 12 : Séquence nucléotidique de la construction pBPL10. Le site de polyclonage est représenté en rose. La séquence peptidique de la protéine de fusion produite lors des expériences d'expression est représentée. La séquence peptidique de la protéase 3CL est en bleu et la séquence peptidique de la luciférase est en rouge.

5. TECHNIQUES GENERALES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

5.1. Amplification PCR

Le protocole de PCR a été standardisé pour toutes les amplifications. La PCR est réalisée dans un volume de 100 µl contenant 1 µl de Taq polymérase à 5 u/µl (Promega), 10 µl de tampon 10X, 2,5 µl de dNTP à 5mM, 1µl d'ADN matrice à 500 ng/µl et 1 µl de chaque oligonucléotide à 100 pmol/µl. L'amplification des fragments est réalisée en 2 étapes successives : 5 cycles à 94°C (1 min), 37°C (1 min) et 72°C (1 min) suivis de 25 cycles à 94°C (1 min), 55°C (1 min) et 72°C (1 min) puis d'un cycle à 72°C (15 min).

Les oligonucléotides qui ont été nécessaires à l'élaboration des différentes amplifications sont regroupés dans le tableau 2.

Tous les produits de PCR après purification (§ 4.2.) sont systématiquement clonés dans le vecteur pGEM-T fourni par Promega (tableau 4).

Tableau 4 : Stockage des produits d'amplification dans le vecteur pGEM-T

Constructions	Inserts	
	Oligonucléotides	matrices
pG18/14	18 et 14	pUGG10
pG35b/108	35b et 108	pUGG10
pG35/211	35 et 211	pUGG10
pG35/212	35 et 212	pUGG10
pG35/213	35 et 213	pUGG10
pG50/123	50 et 123	pT7Luc
pG355/354	355 et 354	pUGG10
pG353/354	353 et 354	pUGG10
pG355/356	355 et 356	pUGG10
pG357/358	357 et 358	pUGG10
pG372/373	372 et 373	pUGG10
pG420/461	420 et 461	pUGG10
pG462/459	462 et 459	pUGG10
pG372/373	372 et 373	pUGG10
pG372/495	372 et 495	pUGG10
pG508/509	508 et 509	Oligonucléotide 507
pG515/516bis	515 et 516bis	pUGG10
pG515bis/516	515bis/516	pUGG10
pG517/518bis	517 et 518bis	pUGG10
pG517bis/518	517bis et 518	pUGG10
pG519/520bis	519 et 520bis	pUGG10
pG519bis/520	519bis et 520	pUGG10
pG521/522bis	521 et 522bis	pUGG10
pG521bis/522	521bis et 522	pUGG10
pG523/524bis	523 et 524bis	pUGG10
pG372/626	372 et 626	pBPLEG10
pG627/628	627 et 628	pBPLEG10

5.2. Purification des inserts

Après amplification les produits PCR sont extraits de gel d'agarose 1% en tampon TAE (Tris Acétate EDTA) à l'aide du kit fourni par Macherey-Nagel (nucleospin extract 2 in 1). Les produits de PCR sont extraits de l'agarose, adsorbés sur résine puis élués.

Les produits de PCR stockés dans le vecteur pGEM-T sont digérés par les enzymes de restriction adéquates selon les prescriptions du fournisseur (Eurogentec) puis purifiés comme décrit précédemment.

5.3. Hybridation des oligonucléotides

L'hybridation des oligonucléotides phosphorylés en 5' (Tab. 3) est réalisée dans un volume de 200 µl contenant 5 nmol de chaque oligonucléotide, 50 mM de tampon Tris-HCl pH8 et 100 mM de NaCl. Le mélange est porté à 100°C pendant 10 min puis laissé dans le bain marie jusqu'à ce que la température redescende à 35°C.

5.4. Préparation du vecteur

Les vecteurs choisis pour les clonages sont tout d'abord digérés par les enzymes de restriction appropriées puis purifiés sur résine (Nucleospin Extract 2 in 1, Macherey-Nagel). Les extrémités 5' du vecteur sont ensuite déphosphorylées par action de la phosphatase alcaline

selon les prescriptions du fournisseur (Promega). Le vecteur est, ensuite, purifié sur résine (Wizard DNA system, Promega) avant ligation avec l'insert.

5.5. Ligation

La ligation entre vecteur et insert est réalisée dans un volume final de 10 µl avec la T4 DNA ligase selon les conditions préconisées par le fournisseur (Eurogentec). La ligation se fait dans un ratio molaire de 1/1. Le mélange réactionnel est incubé une nuit à 12°C puis désactivé 5 min à 56°C avant électroporation.

5.6. Electroporation

Un µl de ligation est ajouté à 50 µl de bactéries *E. coli* TG1 "compétentes" puis électroporé selon les conditions décrites par Dower *et al.* (1988) (appareil Easyject, 2500V-156Ω-25µF, Eurogentec). Les bactéries électroporées sont reprises dans 100 µl de milieu Luria Bertani (LB) puis étalées sur milieu solide supplémenté par de l'ampicilline à 200 ng/µl.

5.7. Minipréparations

Un millilitre et demi de milieu liquide de LB contenant 200µg/ml d'ampicilline estensemencé par une colonie. Après 5h d'incubation sous agitation forte, les suspensions bactériennes sont centrifugées 5 min à 12000g. Une partie du surnageant est retirée et le reste (50µl) est utilisé pour la remise en suspension du culot. Ensuite, il est ajouté 300 µl de TNS (Tris-HCl pH7,4 20 mM, EDTA 1 mM, NaOH 0,1 N et SDS 0,5%) puis après agitation des tubes, 150 µl d'Acétate de Sodium 5M/3M préalablement refroidis. Les tubes sont agités par retournement puis vortexés et incubés 5 min dans la glace. Après centrifugation, l'ADN plasmidique est précipité par 1 ml d'éthanol à 100%. Le culot d'ADN est repris dans 50 µl de tampon de restriction. La sélection des clones positifs est réalisée par digestion enzymatique de minipréparations plasmidiques et analyse sur gel TBE (Tris Borate EDTA) à 0,8%.

5.8. Maxipréparations

Les clones sélectionnés sont mis en culture dans 250 ml de milieu pour la réalisation d'une maxipréparation d'ADN plasmidique à l'aide du kit d'extraction d'ADN nucleobond PC 500 (Macherey-Nagel). Toutes les constructions sont vérifiées dans un premier temps par digestions enzymatiques puis dans un deuxième temps par séquençage.

6. ELABORATION DES DIFFÉRENTES CONSTRUCTIONS

6.1. Elaboration des constructions pBPL

6.1.1. La construction pBPL10

L'amplification du gène de la luciférase à partir du plasmide pBSLucEco^r avec les oligonucléotides 50 et 123 a permis le clonage au site *EcoRI* du vecteur pBSSK(-) du gène de la luciférase muté. La mutation correspondant au remplacement du codon d'initiation par un

site *SaI*. L'amplification à partir du vecteur pUGG10 avec les oligonucléotides 35b et 108 a permis le clonage de la séquence codant pour la protéase 3CL (codons 1108 à 1435) aux sites *XhoI* et *HindIII* en amont du gène muté de la luciférase conduisant, ainsi, à la construction pBPL10 (Fig. 11).

6.1.2. Elaboration des constructions pBPL

Les constructions pBPL11, pBPLEG1, pBPLEG2, pBPLEG3, pBPLEG4, pBPLEG5, pBPLEG6, pBPLEG7, pBPLEG8, pBPLEG9, pBPLEG10, pBPLET, pBPLQG, pBPLQG1 et pBPLQG2 ont été réalisées par clonage direct des oligonucléotides phosphorylés en 5' hybridés entre eux 2 à 2 (Tab. 3) aux sites *NheI-SaI* de la construction pBPL10 déphosphorylée.

La construction particulière de pBPLEG10_{ko} a été réalisée en 2 temps.

Le premier temps a pour but la mutation du gène 3CL. Cette mutation a été réalisée par amplification PCR. La préparation de l'insert a été faite par digestion *NcoI-BglII* de pG372/626 (Tab. 4) et la préparation du vecteur par digestion *NcoI-BglII* de pG627/628 (Tab. 4) puis déphosphorylation. La ligation a permis l'obtention de pG3CL_{ko}.

Le deuxième temps correspond au remplacement du gène de la protéase 3CL fonctionnelle par le gène de la protéase 3CL muté dans le vecteur pBPLEG10. La préparation de l'insert a été faite par digestion *NcoI-SaI* du plasmide pG3CL_{ko} et la préparation du vecteur par digestion *NcoI-SaI* de la construction pBPLEG10 puis déphosphorylation. La ligation de l'insert et du vecteur a permis l'obtention de la construction pBPLEG10_{ko}.

6.1.3. Elaboration des constructions pEG-3CY

- Réalisation de la construction pBPL3CY : l'insert a été préparé par digestion *NcoI-NheI* du vecteur pG372/373 (Tab. 4) puis cloné aux sites *NcoI-NheI* de la construction pBPL10. Par cette opération la séquence codant pour la protéase 3CL a été remplacée par la séquence 3CY (1109-1251).
- Les constructions pEG1-3CY, pEG2-3CY, pEG3-3CY, pEG4-3CY, pEG5-3CY, pEG6-3CY, pEG7-3CY, pEG8-3CY, pEG9-3CY, pEG10-3CY, pET-3CY, pQG1-3CY et pQG2-3CY ont été réalisées par clonage direct des oligonucléotides phosphorylés en 5' et hybridés entre eux 2 à 2 (Tab. 3) aux sites *NheI-SaI* déphosphorylés de la construction pBPL3CY.

6.2. Elaboration des constructions pQ

Pour pallier à l'absence d'Ac spécifique reconnaissant les différentes régions de la polyprotéine, nous avons inséré en 5' ou en 3' des différentes régions polypeptidiques de la polyprotéine du RHDV la séquence Q codant pour l'épitope linéaire de la glycoprotéine S du TGEV (Virus de la gastro-entérite transmissible de porcelet) reconnu par l'Ac monoclonal 3b5 (Delmas *et al.*, 1990). De cette manière, nous avons établi 2 types de constructions. Les constructions pEQP1P2, pEQP22C, pEQ2C3AB et pEQ3C3D présentent l'épitope 3b5 à l'extrémité N-terminale de chaque protéine et les constructions pEP1P2Q, pEP22CQ, pE2C3ABQ, pE3C3DQ et pE3DVP60Q présentent l'épitope 3b5 à l'extrémité C-terminale de chaque protéine. L'élaboration de ces constructions s'est déroulée en 3 temps.

Le premier temps a consisté à stocker séparément les séquences codant pour les polypeptides et l'épitope 3b5 dans le vecteur pGemT (Tab. 4).

Le deuxième temps a été d'installer la séquence codant pour l'épitope 3b5 (Q) en 3' ou en 5' du gène d'intérêt (Tab. 5).

Le 3^{ème} temps a permis d'installer le gène d'intérêt en fusion avec la séquence Q dans un vecteur d'expression, pET22BK (Tab. 6).

Ce vecteur correspond au vecteur pET22B(+) muté de manière à ce que le site *EcoRI* soit dans le bon cadre de lecture. Cinq µg du vecteur pET22B(+) ont été digérés par *BamHI*. Après purification sur colonne (Nucleospin Extract 2 in 1, Macherey-Nagel), le site a été comblé par action du fragment klenow (Eurogentec) selon les directives du fournisseur. On a procédé ensuite à une ligation sur lui-même du vecteur pour obtenir le vecteur pET22BK.

Tableau 5 : Insertion de la séquence de l'épitope 3b5 (Q)

Constructions	Inserts	Vecteurs	Digestions enzymatiques
pQP1P2	pG508/509	pG515bis/516	<i>Bgl II-Xba I</i>
pP1P2Q	pG508/509	pG515/516bis	<i>EcoR I-EcoR V</i>
pQP22C	pG508/509	pG517bis/518	<i>Bgl II-Xba I</i>
pP22CQ	pG508/509	pG517/518bis	<i>EcoR I-EcoR V</i>
pQ2C3AB	pG508/509	pG519bis/520	<i>Bgl II-Xba I</i>
p2C3ABQ	pG508/509	pG519/520bis	<i>EcoR I-EcoR V</i>
pQ3C3D	pG508/509	pG521bis/522	<i>Bgl II-Xba I</i>
p3C3DQ	pG508/509	pG521/522bis	<i>EcoR I-EcoR V</i>
p3DVP60Q	pG508/509	pG523/524bis	<i>EcoR I-EcoR V</i>

Tableau 6 : Dernière étape à l'élaboration des constructions contenant l'épitope 3b5 (Q)

Constructions	Inserts	Vecteurs	Digestions enzymatiques
pEQP1P2	pQP1P2	pET22BK	<i>EcoR I-Not I</i>
pEP1P2Q	pP1P2Q	pET22BK	<i>EcoR I-Not I</i>
pEQP22C	pQP22C	pET22BK	<i>EcoR I-Not I</i>
pEP22CQ	pP22CQ	pET22BK	<i>EcoR I-Not I</i>
pEQ2C3AB	pQ2C3AB	pET22BK	<i>EcoR I-Not I</i>
pE2C3ABQ	p2C3ABQ	pET22BK	<i>EcoR I-Not I</i>
pEQ3C3D	pQ3C3D	pET22BK	<i>EcoR I-Not I</i>
pE3C3DQ	p3C3DQ	pET22BK	<i>EcoR I-Not I</i>
pE3DVP60Q	p3DVP60Q	pET22BK	<i>EcoR I-Not I</i>

6.3. Elaboration des constructions portant les gènes d'intérêt

Différentes parties du génome du RHDV ont été clonées en vecteur d'expression sous promoteur T7. L'élaboration de ces différentes constructions est décrite dans le tableau 7.

Tableau 7 : Constructions permettant l'expression de gènes d'intérêt

Constructions	Inserts	Vecteurs	Digestions enzymatiques
pET3D	pG353/354	pET22B(+)	<i>Vsp I-BamH I</i>
pET3CX	pG35/211	pET22B-Leader	<i>BamH I-EcoR I</i>
pET3CY	pG35/212	pET22B-Leader	<i>BamH I-EcoR I</i>
pET3CZ	pG35/213	pET22B-Leader	<i>BamH I-EcoR I</i>
pET3CD	pG355/354	pET22B(+)	<i>Nde I-BamH I</i>
pBP3CL	pG35b/108	pBSSK(-)	<i>Xho I-Hind III</i>
pETP1	pG357/358	pET22B(+)	<i>Nde I-BamH I</i>
pETEG2-EG4	pG420/461	pET22BK	<i>EcoR I-Sal I</i>
pETEG4-EG7	pG462/459	pET22BK	<i>EcoR I-Sal I</i>
pETVP60	pG18/14	pET22B-Leader	<i>BamH I</i>

6.4. Mutagenèse aléatoire du dipeptide EG2

L'élaboration des constructions pBPLXX correspondant aux constructions portant le site EG2 muté a été réalisée en plusieurs étapes (Fig. 13) :

- Elaboration du vecteur pBPL3CL : ce vecteur comporte un site de polyclonage en 3' du gène de la protéase différent de celui de pBPL10 avec, notamment, un site de restriction *NsiI* qui par digestion libre une extrémité 3' sortant indispensable pour le principe de la manipulation. La préparation de l'insert se fait par digestion *NcoI-SalI* du plasmide pG372/495 (Tab. 3) et la préparation du vecteur se fait par digestion *NcoI-SalI* de la construction pBPL10 puis déphosphorylation. La ligation de l'insert et du vecteur ainsi réalisée permet d'obtenir la construction pBPL3CL.
- La construction pBPL3CL est digérée par *NsiI* puis liguée avec l'oligonucléotide 496 dans un rapport moléculaire 1/1000. Cet oligonucléotide code pour l'environnement du site EG2 et est dégénéré sur les 6 bases des 2 codons correspondant au dipeptide EG, il présente, aussi, 1 site de restriction *SalI*.
- Le produit de ligation est comblé par action du fragment klenow (Eurogentec). Cette opération permet de synthétiser le brin complémentaire des bouts flottants formés par les oligonucléotides 496.
- Une digestion *SalI* du vecteur linéaire permet d'une part de le débarrasser de l'oligonucléotide 496 situé en 5' et d'autre part de rendre les 2 extrémités de la construction compatibles pour pouvoir refermer le plasmide sur lui-même.

Ainsi, le mélange de ligation contient diverses constructions pBPLXX.

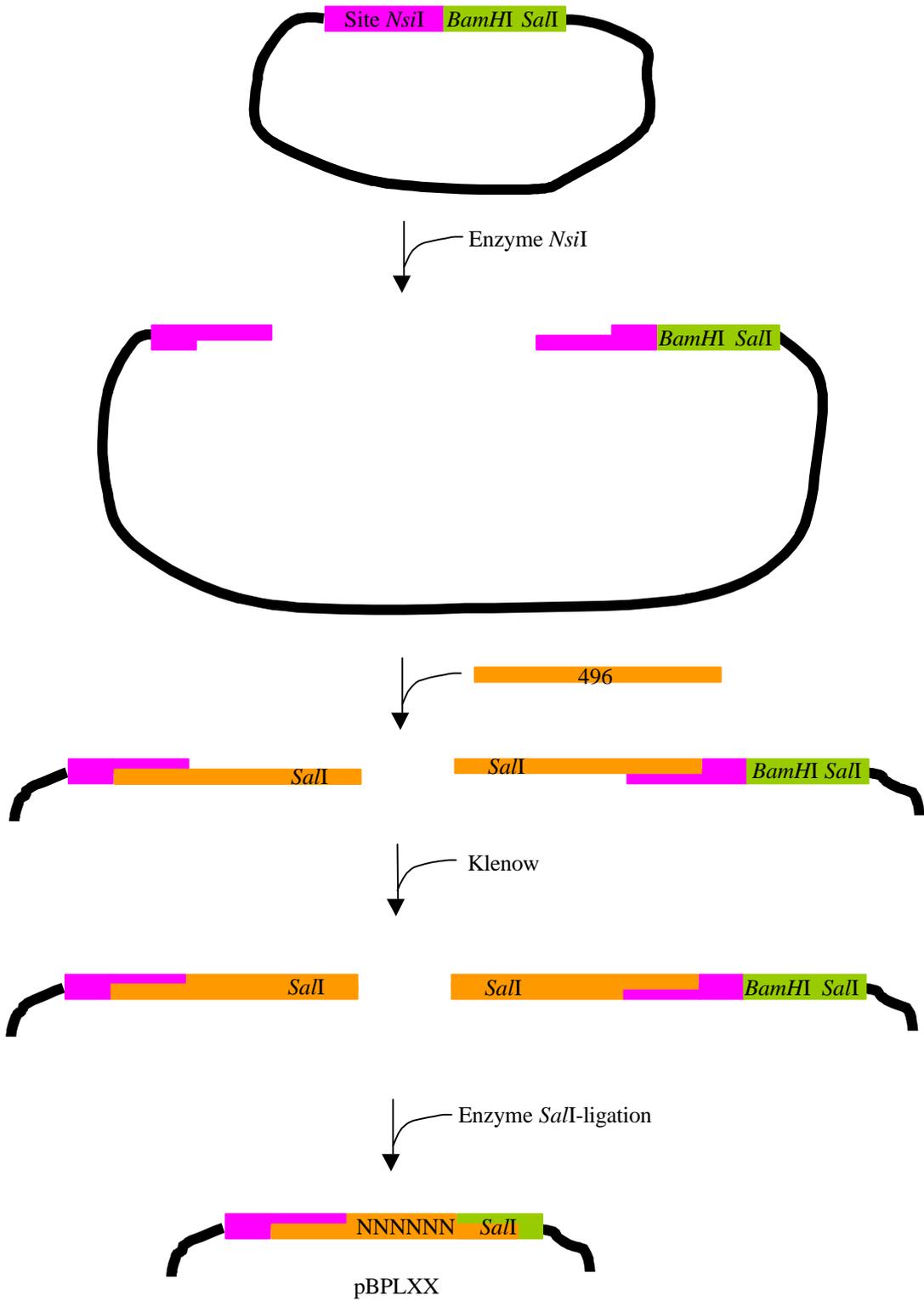


Figure 13 : Protocole d'obtention des constructions pBPLXX.

7. PRÉPARATION DES EXTRAITS CELLULAIRES

Que ce soit pour la lignée cellulaire RK13 ou LMH, l'extrait cellulaire a été préparé selon le même protocole.

Après lavage avec du milieu MEME (Gibco-BRL), les cellules en phase exponentielle de 4 boîtes de culture de 100 mm sont décollées au râteau stérile puis centrifugées pendant 7 min à 1000 rpm. Le culot cellulaire est lavé avec du PBS 1X puis lysé mécaniquement dans 4 volumes d'une solution tamponnée (HEPES pH7,9 10 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, DTT 1 mM et PMSF 0,1 mM). Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation de 10 min à 4300g. Le surnageant est conservé dans 15% de glycérol à -80°C.

8. SYSTEMES D'EXPRESSION

8.1. Système TNT7/lysate de réticulocytes

Le système TNT7/lysate de réticulocytes de lapin (Promega) est un système eucaryote acellulaire qui permet la transcription des gènes d'intérêt installés sous le promoteur T7 et la traduction couplée des ARNm dans la même mélange réactionnel.

- Expression en marquage radioactif : l'expression est réalisée dans un volume total de 25 µl qui comprend 12,5 µl de TNT lysate de réticulocytes de lapin, 1 µl de tampon TNT, 0,5 µl d'acides aminés sans la méthionine, 2 µl de méthionine S³⁵ (Amersham), 0,5 µl de TNT RNA polymérase, 0,5 µl de RNAsin (Promega), et 500 ng de chaque plasmide intervenant dans la réaction. Le milieu réactionnel est incubé 3 h à 30°C. Une fraction aliquote de 5 µl est déposée sur gel de polyacrylamide.
- Expression à froid : l'expression est réalisée dans un volume de 15 µl qui comprend 7,5 µl de TNT lysate de réticulocytes de lapin, 0,6 µl de tampon TNT, 0,3 µl d'acides aminés sans méthionine, 0,3 µl d'acides aminés sans leucine, 0,3 µl de TNT RNA polymérase, 0,3 µl de RNAsin et 100 ng de chaque plasmide intervenant dans la réaction. La mesure de l'activité luciférase est réalisée à partir de 2 fois 5 µl pour chaque réaction.

8.2. Système vaccine T7/cellules de rein de lapin

L'expression transitoire dans les cellules RK13 est réalisée selon Fuerst *et al.* (1986) (Fuerst *et al.*, 1986). Brièvement, les cellules RK13 sont mises en culture sur des plaques 24 puits 48h avant la transfection. Les cellules sont infectées avec le virus recombinant de la vaccine vTF7-3 à une multiplicité d'infection de 20. Après incubation d'une heure à 37°C, 1µg de plasmide est transfecté dans les cellules à l'aide de lipofectine suivant les prescriptions du fournisseur (GibcoBRL). La mesure de l'activité luciférase est réalisée 5 h post transfection.

9. TECHNIQUES D'ANALYSE DES PRODUITS D'EXPRESSION

9.1. Gel de séparation SDS-PAGE

Les protéines sont analysées par électrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide-SDS (Laemmli 1970).

Les gels sont fixés en tampon éthanol-acétate (acide acétique 10%, éthanol 20% et glycérol 5%) puis séchés sous vide avant d'être autoradiographiés.

9.2. La technique du western-blot

Les protéines, séparée en gel SDS-PAGE, sont transférées sur des membranes de nitrocellulose renforcées (Macherey-Nagel) par électrophorèse en tampon CAPS pH11 10 mM (Sigma) pendant 1 h à 50 V (miniblotteur, Biorad). Les membranes sont incubées à 4°C pendant 1 nuit dans une solution à 3% de lait écrémé dans le tampon de Western-blot (Tris-HCl pH7,4 20mM, NaCl 140 mM, Tween 20 0,05%). Les membranes sont ensuite incubées pendant 2 h à 37°C en présence du sérum polyclonal puis d'un Ac anti-lapin couplé à la phosphatase alcaline (Sigma) dans le tampon Western-blot 3% de lait écrémé. Entre chaque étape, les membranes sont lavées extensivement en tampon Western-blot 1% de lait écrémé. La révélation est réalisée avec 5 ml de chacun des réactifs, BCIP-NBT (ZYMED).

9.3. Immunoprécipitation

Après traduction en système LRL, 15 µl de milieu réactionnel radiomarqués sont dilués dans 200 µl de tampon RIPA (Tris-HCl pH8 40 mM, NaCl 500mM et Triton 1X). Il est ajouté 4 µl de sérum polyclonal ou 1 µl d'ascite monoclonal. Le mélange est incubé une heure à température ambiante. L'immunoprécipitation est réalisée en ajoutant au milieu précédent 35 µl de protéine A Sépharose (Pharmacia) suspendue en tampon RIPA. Après incubation d'une heure à température ambiante sous agitation, les billes de protéine A Sépharose sont lavées par 2 fois avec 200 µl de RIPA et une fois avec 200 µl de tampon Tris-HCl pH8 10 mM. Après centrifugation, le culot de billes est repris dans 30 µl de tampon de charge 1X (β-mercaptoéthanol 5%, SDS 2%, glycérol 10% et Tris-HCl pH6,8 25 mM) et 25 µl sont déposés sur gel de polyacrylamide.

10. MESURE DE L'ACTIVITÉ LUCIFÉRISE (NGUYEN ET AL., 1988)

- Système LRL : 5 µl de produits d'expression sont repris dans 100 µl de tampon luciférase (Tris-HCl pH7,4 25 mM, MgCl₂ 8 mM, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, Triton 100X 1%, BSA 1% et glycérol 15%). L'activité luciférase est mesurée par un luminomètre (Autolumat LB 953 Berthold) qui injecte automatiquement 100 µl de tampon luciférine (50 ml de tampon luciférase, 50 µl de luciférine à 6,25 mg/ml et 20 µl d'ATP à 100 mM). La lecture est effectuée 5 ms après l'injection et sur une période de 10 s.
- Système vvT7/RK13 : chaque puits de cellules transfectées est repris dans 200 µl de tampon luciférase. Une fraction aliquote de 100 µl est utilisée pour la mesure de l'activité luciférase comme décrit précédemment.

- Calculs de pourcentage :

Dans le cas de l'expression des constructions pBPL ou pEG-3CY seules, un essai correspond à 4 mesures d'activité luciférase pour chaque construction (2 mesures à partir de 2 clones indépendants). Dans le cas des expériences de coexpression, 2 mesures ont été réalisées à partir d'un seul clone. Le niveau de RLU (Relative Light Units) mesuré s'étalait de 100 000 à 1000 000 dans le système LRL et de 50 000 à 5000 000 dans le système vVT7/RK13.

Une moyenne du nombre de RLU est, d'abord, réalisée pour chaque clone. Chaque mesure d'activité luciférase est rapportée à celle du témoin interne pour chaque essai. Le résultat donné correspond au calcul de la moyenne des pourcentages calculés au sein de chaque essai pour chaque type de conditions expérimentales. L'écart à la moyenne renvoie la moyenne des écarts absolus des résultats par rapport à leur moyenne arithmétique, elle reflète la dispersion dans un ensemble de données. Il n'est donc calculé que pour les expériences où il a pu être fait au moins 2 essais.

Avant que ne débute ce travail, 3 dipeptides EG avaient été identifiés comme sites de clivage pour la protéase 3C-like à l'aide d'un système d'expression acellulaire (Boniotti *et al.*, 1994, Wirblich *et al.*, 1995). Nous ne disposions pas de système de culture de cellules efficace pour répliquer le RHDV, les différents essais de mise en culture effectués au laboratoire s'étaient avérés non productifs. Par ailleurs, Denis Rasschaert avait remarqué au cours de différents travaux que lorsque le gène rapporteur luciférase était exprimé en fusion à l'extrémité C-terminale d'une autre protéine, la protéine de fusion qui en résultait pouvait perdre de façon radicale son activité luciférase. Sur la base de cette observation, il a été développé une nouvelle technique pour tester l'efficacité de clivage de la protéase 3C-like du RHDV au niveau de tous les dipeptides EG présents le long de la polyprotéine dont les 3 sites EG déjà identifiés (Fig. 11). Le principe de cette technique repose sur la réalisation de constructions contenant sous le promoteur T7 le gène de la protéase virale en fusion avec le gène de la luciférase avec à la jonction des 2 gènes une région cassette de clonage permettant d'insérer les séquences codant pour les sites à tester. Ce travail de construction a débuté lors du DEA de Carine Pautigny (1996), à une époque où la possibilité du clivage au niveau du site ET (1251-1252) (Wirblich *et al.*, 1996) n'était pas suggérée. Aussi, les bornes de la séquence codant pour la protéase avaient été choisies entre les codons 1109 et 1435 (entre les sites EG (1108-1109) et EG (1435-1436)) sachant que le dipeptide EG (1169-1170) n'était pas clivé. Les constructions, qui en ont résulté, ont pu être utilisées dans un système d'expression eucaryote acellulaire (TNT7/lysate de réticulocytes de lapin) et dans un système d'expression transitoire en cellules de rein de lapin (vaccin T7/ cellules RK13).

1. VALIDATION DE LA TECHNIQUE

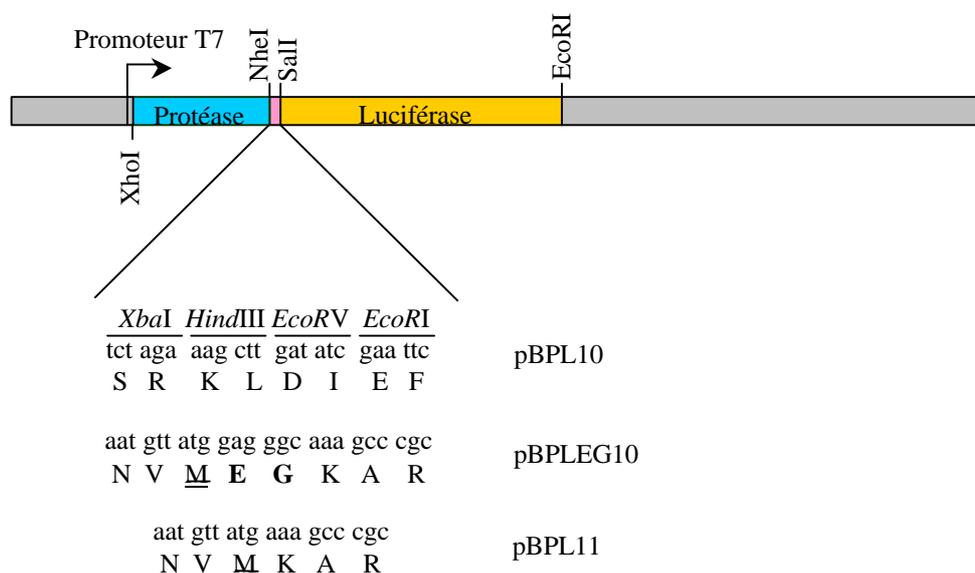


Figure 14 : Représentation schématique des constructions pBPL10, pBPL11 et pBPLEG10. Les parties grisées de la construction correspondent au plasmide pBS SK(-). Les séquences codant pour la protéase 3CL, pour la luciférase et pour la région cassette sont symbolisées en bleu, en jaune, et en rose. Les méthionines suspectées de générer la bande de 62 kDa lors de l'expression des constructions pBPLEG10 et pBPL11 sont soulignées.

Dans le but de valider cette technique originale fondée sur la fusion de la protéase à la luciférase, 4 constructions pBPL10, pBPLEG10, pBPL11 et pBPLEG10_{ko} ont été réalisées. La construction pBPL10 contient, sous le promoteur T7, les gènes de la protéase 3CL (compris entre les codons 1109 et 1435) et de la luciférase en fusion avec un site de polyclonage (*Nhe*I, *Xba*I, *Hind*III, *Eco*RV, *Eco*RI et *Sal*I) à la jonction de ces 2 gènes (Fig. 14). La construction pBPLEG10 dérivée de la construction pBPL10 contient à la jonction des 2 gènes, la séquence codant pour le site EG10 (1767-1768) et pour les 6 acides aminés environnants (3 acides aminés de part et d'autre). Le site EG10 est le site qui permet la libération de la protéine de capsid lors de la maturation de la polyprotéine (Boniotto *et al.*, 1994, Martin Alonso *et al.*, 1996, Wirblich *et al.*, 1995, Wirblich *et al.*, 1996). La construction pBPL11 proche de la construction pBPLEG10 contient la séquence codant pour l'environnement peptidique du dipeptide EG10 sans la séquence codant pour le dipeptide lui-même. Enfin, la construction pBPLEG10_{ko} est une construction dérivée de pBPLEG10, dans laquelle le gène de la protéase a été modifié, conduisant à la production d'une protéase mutée au niveau du site nucléophile cys-1212 et des 2 acides aminés environnants (Asp-Cys-Gly changés en Glu-Ile-Trp).

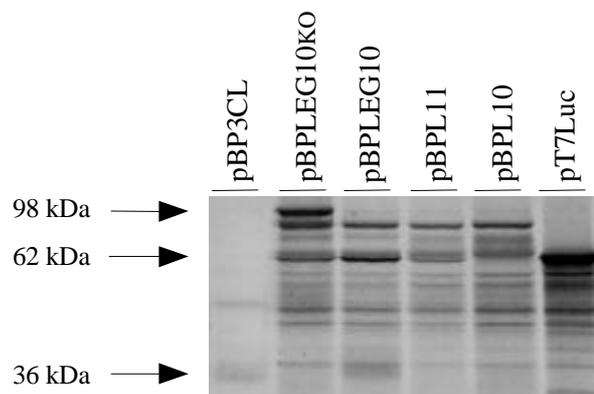


Figure 15 : Etude de l'efficacité du clivage protéolytique au niveau du site EG10. Autoradiographie après séparation en gel SDS-page à 12,5% en polyacrylamide des produits radiomarqués obtenus par traduction en système TNT7-lysate de réticulocytes de lapin (LRL). Les constructions utilisées pour les expériences de traduction *in vitro* sont indiquées au-dessus des puits. Les chiffres indiqués sur la gauche des autoradiographies correspondent aux masses moléculaires de la protéine de fusion (98 kDa), de la luciférase (62 kDa) et de la protéase 3CL (36 kDa).

Les protéines obtenues après expression des constructions pBPLEG10 κ O, pBPLEG10, pBPL11, pBPL10 et des 2 constructions contrôles pBP3CL (clonage du gène de la protéase 3CL sous le promoteur T7 du vecteur pBSSK (-)) et pT7Luc (plasmide fourni par Promega permettant la production de la luciférase), ont été résolues en gel SDS-PAGE 12,5% en polyacrylamide (Fig. 15). L'expression de la construction pBPLEG10 κ O conduit à une bande intense de 98 kDa correspondant à la masse moléculaire de la protéine de fusion. Alors que l'expression des constructions pBPL10, pBPL11 et pBPLEG10 conduit à une bande de 98 kDa de faible intensité. Par ailleurs, le profil correspondant à l'expression de la construction pBPLEG10 fait apparaître 2 bandes caractéristiques des témoins pT7Luc et pBP3CL ; soit la bande de 62 kDa correspondant à la luciférase et la bande de 36 kDa correspondant à la protéase. L'apparence floue de la bande à 36 kDa résulte de la migration du produit de traduction attendu (36 kDa) et du produit de traduction initié au premier AUG interne qui conduit à la synthèse d'une protéine de 34 kDa. Ce phénomène d'initiation interne est classiquement rencontré lors de l'expression en système lysate de réticulocytes de lapin. Par ailleurs, sur le profil électrophorétique de pBPLEG10 κ O et de pBPL11 une bande de 62 kDa de plus faible intensité est décelable mais elle n'est pas associée à la bande de 36 kDa caractéristique de la protéase. Une fois encore, il semble que la bande de 62 kDa soit la conséquence d'une initiation interne de la traduction au niveau de l'AUG situé, dans ces 2 constructions, juste en amont du gène de la luciférase (Fig. 14). Cette hypothèse est d'autant plus solide que le profil électrophorétique correspondant à l'expression de pBPL10 ne présente aucune bande de 62 kDa et de 36 kDa.

En d'autres termes, l'apparition associée des bandes à 62 et 36 kDa rend compte du clivage de la protéine de fusion (98 kDa) conduisant à la libération de la luciférase (62 kDa) et de la protéase 3CL (36 kDa). Ce clivage n'a lieu qu'en présence du site EG10 et de la protéase 3CL fonctionnelle sur la protéine de fusion.

Tableau 8 : Activités luciférase obtenues après l'expression des constructions pBPLEG10, pBPL10 et pBPL11 en système LRL.

Constructions	Activités luciférase (%) [‡]
pBPLEG10	100*
pBPL10	27
pBPL11	31

*L'activité luciférase de pBPLEG10, choisie comme référence, est fixée à 100%

[‡]Les valeurs d'activité luciférase résultent de la moyenne des pourcentages calculés à partir de 5 essais réalisés avec 2 clones différents

Dans le but de corréliser la présence de la luciférase sur le gel (bande de 62 kDa) avec l'activité enzymatique de cette dernière, nous avons mesuré l'activité luciférase détectable dans le mélange réactionnel après expression des constructions pBPLEG10, pBPL10 et pBPL11 en système LRL (Tab. 8). Pour standardiser les résultats, au sein de chaque essai les activités luciférase ont été exprimées en pourcentage de l'activité obtenue avec pBPLEG10.

Ainsi, les activités luciférase issues de l'expression de pBPL10 et pBPL11 représentent 27 et 31 % de celle de pBPLEG10. Etant donné que pBPLEG10 est la seule construction permettant la libération de la protéase et de la luciférase par clivage de la protéine de fusion (bandes à 62 et 36 kDa détectables), ces premiers résultats ont montré que le bruit de fond, lié aux initiations de traduction aux niveaux des AUG internes qui induisent l'apparition des bandes surnuméraires sur le gel (Fig. 15), est de l'ordre de 30%.

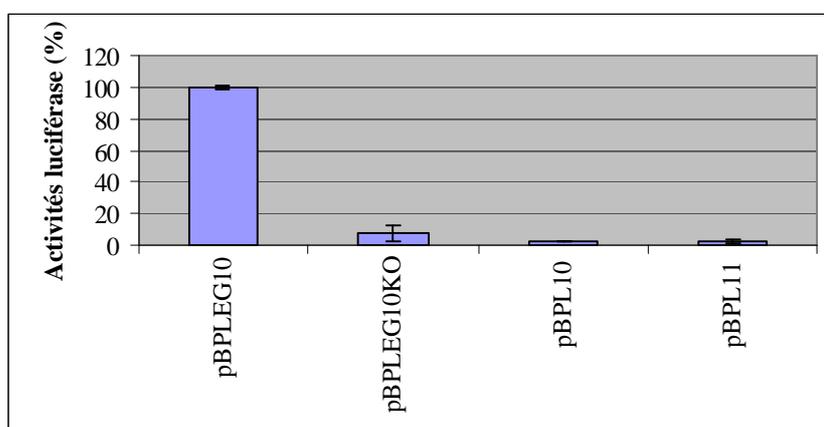


Figure 16 : Histogramme récapitulatif des activités luciférase obtenues après expression des constructions pBPLEG10, pBPLEG10ko, pBPL10 et pBPL11 en système vvT7/RK13. Les activités luciférase sont rapportées en pourcentage de celle de pBPLEG10 dans chaque essai. Les valeurs d'activités luciférase résultent de la moyenne du pourcentage calculée à partir de 4 essais réalisés avec 2 clones différents.

Afin de confirmer ces résultats, nous avons transfecté les constructions pBPLEG10, pBPLEG10ko, pBPL10 et pBPL11 dans des cellules de lignée de rein de lapin (RK13), infectées par le virus de la vaccine T7 (système vvT7/RK13). Ce système d'expression

eucaryote cellulaire transitoire reflète des conditions plus proches de celles rencontrées *in vivo* mais, surtout, il permet d'empêcher le phénomène des initiations internes observé lors de l'expression dans le système LRL. Les activités luciférase issues de l'expression des constructions pBPL10, pBPL11, pBPLEG10 et pBPLEG10_{ko} dans le système vvT7/RK13 ont été mesurées et rapportées en pourcentage de celle de pBPLEG10 (Fig. 16). On constate que les activités luciférase correspondant aux expressions des constructions pBPL10, pBPL11 et pBPLEG10_{ko} ne dépassent pas 8% de l'activité de pBPLEG10. Cette valeur servira de référence pour évaluer le bruit de fond dans les expériences ultérieures.

La chute drastique de l'activité luciférase par mutation du site catalytique de la protéase ou du site de clivage EG10 confirme que l'activité luciférase est significativement augmentée par le clivage de la protéine de fusion et, par conséquent, par la libération de la luciférase. En d'autres termes, ces résultats confirment la validité du test, c'est à dire que l'activité luciférase est directement liée à l'activité catalytique de la protéase 3CL sur le site placé en *cis*.

Enfin, dans le but de confirmer que la chute de l'activité luciférase correspondant à l'expression de pBPLEG10_{ko} était due à la perte de fonctionnalité de la protéase 3CL, nous avons procédé à la cotransfection des constructions pBPLEG10_{ko} et pET3CD. La construction pET3CD contient sous le promoteur T7 la séquence codant pour l'intermédiaire de maturation 3CD. Les mesures d'activité luciférase obtenues sont présentées figure 17. L'activité luciférase liée à l'expression de pBPLEG10_{ko} en système vvT7/RK13 représente 7,6% de l'activité correspondant à pBPLEG10 alors que l'activité luciférase liée à la cotransfection de pBPLEG10_{ko} avec pET3CD représente 109% de l'activité correspondant à la cotransfection de pBPLEG10 avec pET3CD. Comme attendu, ce résultat montre que la complémentation en *trans* de l'activité de la protéase mutée de pBPLEG10_{ko} par la protéase 3CD restaure l'activité luciférase. De plus, il confirme l'hypothèse que la protéase 3CD présente une activité protéolytique en *trans* sur le site EG10 et, surtout, qu'il sera possible par la suite d'appréhender avec cette technique l'efficacité de clivage en *trans* de différentes formes de la protéase.

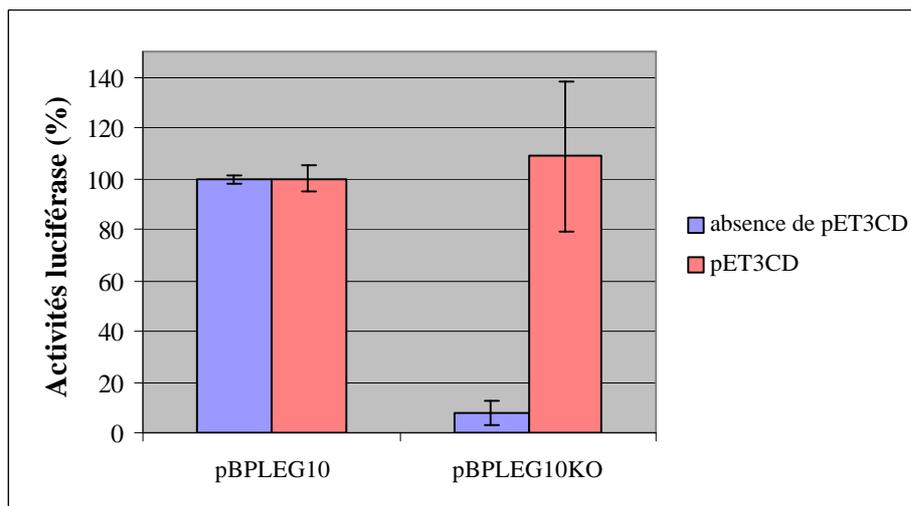


Figure 17 : Histogramme récapitulatif des activités luciférase obtenues après expression des constructions pBPLEG10, pBPLEG10ko et coexpression des constructions pBPLEG10 et pBPLEG10ko avec la construction pET3CD en système vT7/RK13. Les activités luciférase sont rapportées en pourcentage de celle de pBPLEG10 dans chaque essai. Les valeurs d'activité luciférase résultent de la moyenne des pourcentages calculés à partir de 2 essais réalisés avec 2 clones différents.

2. IDENTIFICATION DES SITES DE MATURATION

2.1. Recherche de nouveaux sites de maturation après clivage en cis par la protéase 3CL

Les précédentes études ayant montré la forte propension de la protéase 3C-like du RHDV à cliver la polyprotéine au niveau de dipeptides EG (Boniotti *et al.*, 1994, Martin Alonso *et al.*, 1996, Wirblich *et al.*, 1995), nous avons voulu analyser l'activité protéolytique en *cis* de la protéase 3CL au niveau de tous les dipeptides EG présents sur la polyprotéine. L'analyse de la séquence de la polyprotéine du RHDV révèle 10 dipeptides EG que pour plus de facilités nous avons numéroté de 1 à 10 : EG1 (54-55), EG2 (143-144), EG3 (338-339), EG4 (718-719), EG5 (776-777), EG6 (823-824), EG7 (1108-1109), EG8 (1169-1170), EG9 (1435-1436) et EG10 (1767-1768) (Fig. 11). Les séquences codant pour ces dipeptides EG et 3 acides aminés de part et d'autre du dipeptide ont été clonées au niveau des sites *NheI-SalI* du vecteur pBPL10 générant les constructions pBPLEG1 à pBPLEG9. Pour compléter cette étude nous avons aussi réalisé les constructions pBPLET et pBPLQG. La construction pBPLET contient le site ET (1251-1252) qui a été décrit comme le site permettant le clivage en C-terminal de la protéase 3C-like (Wirblich *et al.*, 1995). La construction pBPLQG contient la séquence codant pour un dipeptide QG installé dans le même environnement que le dipeptide EG10.

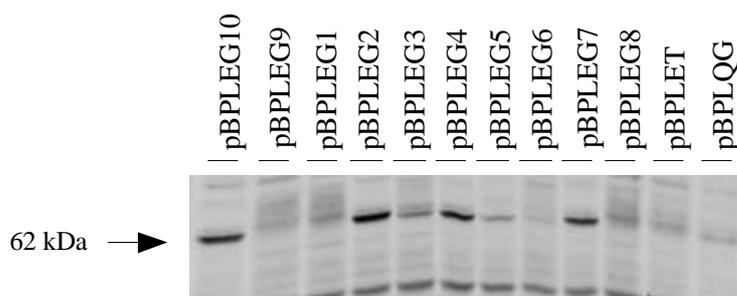


Figure 18 : Visualisation de l'activité protéolytique en *cis* de la protéase 3CL sur les 12 dipeptides étudiés. Autoradiographie après séparation en gel SDS-page à 10% en polyacrylamide des produits radiomarqués obtenus par traduction en système TNT7-lysate de réticulocytes de lapin. Les constructions utilisées pour les expériences de traduction *in vitro* sont indiquées au-dessus des puits. A gauche de l'autoradiographie est indiquée la masse moléculaire de la luciférase.

La comparaison des profils électrophorétiques des produits radiomarqués obtenus lors de l'expression en système LRL des différentes constructions fait ressortir une différence d'intensité au niveau de la bande à 62 kDa (Fig.16). En effet, cette bande apparaît très intense pour les profils électrophorétiques de pBPLEG2, pBPLEG4, pBPLEG7 et pBPLEG10, d'une intensité plus faible pour pBPLEG3, pBPLEG5 et pBPPLQG et aucune bande de 62 kDa n'est décelable pour pBPLEG1, pBPLEG6, pBPLEG8, pBPLEG9 et pBPLET.

Parallèlement, l'activité protéolytique en *cis* de la protéase 3CL sur ces différents dipeptides a été analysée par mesure de l'activité luciférase en systèmes LRL et vvT7/RK13 (Tab. 9, Fig. 20).

Tableau 9 : Activités luciférase obtenues après expression des constructions pBPLEG1 à 10, pBPLET, pBPLQG, pBPLQG1 et pBPLQG2 en systèmes LRL et vvT7/RK13.

Constructions	Activités luciférase (%)	
	LRL	vvT7/RK13
pBPLEG1	37±6 [‡]	3,5±2 [‡]
pBPLEG2	102±10[‡]	133±2[‡]
pBPLEG3	51±9 [‡]	19±3 [‡]
pBPLEG4	108±22[‡]	170±40[‡]
pBPLEG5	54±11 [‡]	15±2 [‡]
pBPLEG6	41±7 [‡]	10±3 [‡]
pBPLEG7	98±14[‡]	139±35[‡]
pBPLEG8	38±8 [‡]	9±1,5 [‡]
pBPLEG9	24±3 [‡]	3,9±2 [‡]
pBPLEG10	100*±5[‡]	100*±3,4[‡]
pBPLET	41±9 [‡]	4,8±2,5 [‡]
pBPLQG	50±3 [‡]	23±4 [≡]
pBPLQG1	41±7 [‡]	0,7±0,2 [≡]
pBPLQG2	30±3 [‡]	2,2±0,9 [≡]

* L'activité luciférase de pBPLEG10, choisie comme référence, est fixée à 100%

[‡] Les valeurs d'activité luciférase résultent de la moyenne des pourcentages calculés à partir de 10 essais réalisés avec 2 clones différents

[†] Les valeurs d'activité luciférase résultent de la moyenne des pourcentages calculés à partir de 5 essais réalisés avec 2 clones différents

[≡] Les valeurs d'activité luciférase résultent de la moyenne des pourcentages calculés à partir de 2 essais réalisés avec 2 clones différents

Ces résultats permettent de rassembler les différentes constructions en 3 groupes selon leur taux d'activité luciférase après expression en système LRL : 98 à 108% pour les constructions pBPLEG2, pBPLEG4, pBPLEG7 et pBPLEG10, 50 à 54% pour les constructions pBPLEG3, pBPLEG5 et pBPLQG et de 24 à 41% pour les constructions pBPLEG1, pBPLEG6, pBPLEG8, pBPLEG9 et pBPLET. Un regroupement identique peut être réalisé en fonction de l'activité luciférase après expression des constructions en système vvT7/RK13 : 100 à 170% pour les constructions pBPLEG2, pBPLEG4, pBPLEG7 et pBPLEG10, 15 à 23% pour les constructions pBPLEG3, pBPLEG5 et pBPLQG et 3 à 10% pour les constructions pBPLEG1, pBPLEG6, pBPLEG8, pBPLEG9 et pBPLET. Ainsi, on constate que les activités luciférase mesurées dans les 2 systèmes conduisent à un regroupement identique des différentes constructions (Tab. 9). De plus, au regard de l'efficacité de clivage de la protéase 3CL sur chaque dipeptide, l'ensemble des activités luciférase est en parfaite corrélation avec l'intensité des bandes analysées en gel SDS-PAGE (Fig. 18). Il est important de noter qu'il y a une réelle gradation dans les résultats qui est le reflet direct de l'efficacité du clivage par la protéase. Ainsi, ces résultats nous ont permis d'établir que 4 sites, EG2, EG4, EG7 et EG10 induisent une très bonne activité protéolytique en *cis*, 5 sites, EG1, EG6, EG8, EG9 et ET n'induisent aucune activité (de l'ordre du bruit de fond) et 3 sites, EG3, EG5 et QG induisent une activité faible mais significative. Ces résultats décrivent pour la première fois le site EG2 comme un site très bien clivé par la protéase du RHDV.

Par ailleurs, remarquons que les constructions aboutissant à des valeurs d'activités luciférase supérieures à 50% après expression en système LRL génèrent des valeurs significativement supérieures au bruit de fond après expression en système vvT7/RK13. Aussi, comme nous ne disposons pas de repère pour définir une corrélation entre les 2 systèmes, pour des valeurs comprises entre 41 et 50% dans le système LRL, lors des expériences ultérieures nous avons considéré que seuls les résultats d'activité luciférase supérieurs ou égaux à 50% en système LRL étaient significatifs.

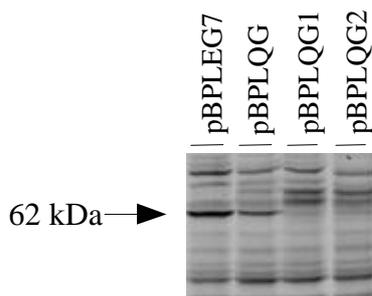
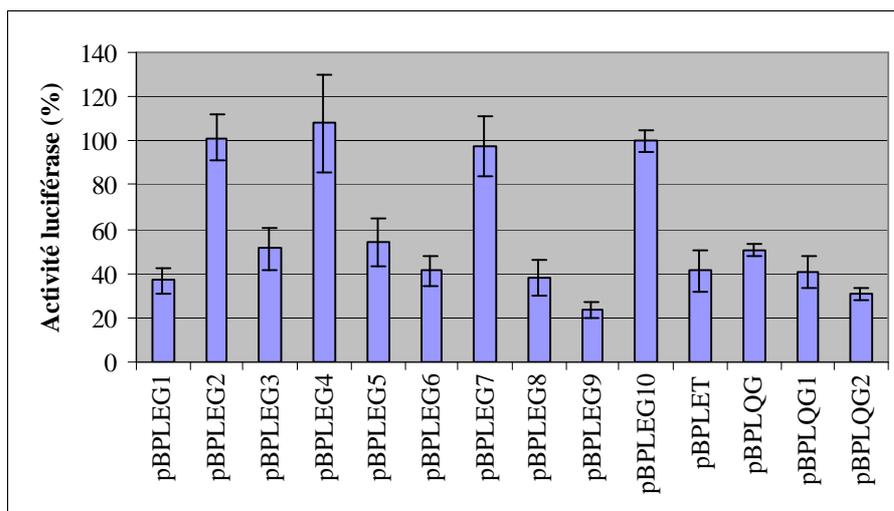


Figure 19 : Etude du clivage en *cis* des dipeptide QG par la protéase 3CL. Autoradiographie après séparation en gel SDS-PAGE à 10% en polyacrylamide des produits radiomarqués obtenus par traduction en système TNT7-lysate de réticulocytes de lapin (LRL). Les constructions utilisées dans les expériences de traduction sont indiquées au-dessus des puits. A gauche est indiquée la masse moléculaire de la luciférase (62 kDa).

Etant donné qu'un dipeptide QG installé dans le même environnement que le dipeptide EG10 permettait une faible coupure en *cis* par la protéase 3CL (50% d'activité luciférase en système LRL et 23% en système vvT7/RK13), nous nous sommes demandés si les dipeptides QG1 (940-941) et QG2 (993-994) situés au sein de la polyprotéine aux environs de l'extrémité N-terminale de la VPg n'étaient pas spécifiquement clivés en *cis* par la protéase 3CL. Et ce, à seule fin de définir le clivage en N-terminal de la VPg observé par König *et al.* (1998) non explicable par la présence d'un dipeptide EG. La comparaison des profils électrophorétiques des produits radiomarqués obtenus lors de l'expression en système LRL des constructions pBPLEG7, pBPLQG, pBPLQG1 et pBPLQG2 fait ressortir l'absence de bande à 62 kDa pour les constructions pBPLQG1 et pBPLQG2 (Fig. 19). De même, l'activité luciférase liée à l'expression des constructions pBPLQG1 et pBPLQG2 est de 42 et 30 % en système LRL (Fig. 20A) et de 2,2 et 0,7% en système vvT7/RK13 (Fig. 20B). Ces résultats indiquent que dans ces conditions expérimentales, la protéase 3CL ne montre pas d'activité protéolytique en *cis* sur les octapeptides centrés sur QG1 ou QG2.

A.



B.

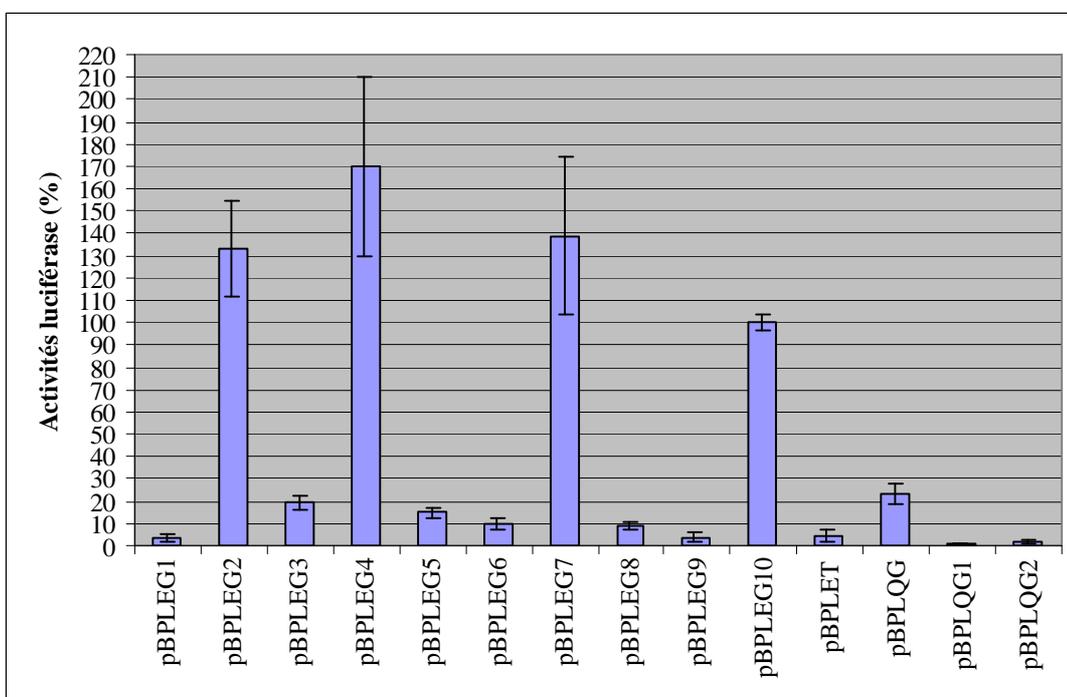


Figure 20 : Histogramme récapitulatif des activités luciférase obtenues après expression des constructions pBPLEG1 à 10, pBPLET, pBPLQG, pBPLQG1 et pBPLQG2 en systèmes LRL (A) et vT7/RK13 (B). Les activités luciférase sont rapportées en pourcentage de celle de pBPLEG10 dans chaque essai.

2.2. Efficacité de coupure en *cis* de la protéase 3CY

Wirblich *et al.* (1995) ayant défini une activité protéolytique au niveau des sites EG7 et ET en système bactérien, nous avons voulu tester la capacité de la protéase, définie entre ces 2 sites (3CY), à cliver en *cis* les sites EG1, EG2, EG3, EG4, EG5, EG6, EG7, EG9, EG10, ET, QG1 et QG. Pour ce faire, nous avons réalisé la construction pBPL10-3CY. Cette construction correspond à la construction pBPL10 où la séquence codant pour le polypeptide 3CL a été

remplacée par la séquence codant pour le polypeptide 3CY aux sites de restriction *NcoI-NheI*. Les séquences codant pour les dipeptides EG1, EG2, EG3, EG4, EG5, EG6, EG7, EG8, EG9, EG10, ET, QG1 et QG2 et 3 acides aminés de part et d'autre du dipeptide ont été clonées au niveau des sites *NheI-SalI* du vecteur pBPL10-3CY générant les constructions pEG1-3CY, pEG2-3CY, pEG3-3CY, pEG4-3CY, pEG5-3CY, pEG6-3CY, pEG7-3CY, pEG8-3CY, pEG9-3CY, pEG10-3CY, pQG1-3CY et pQG2-3CY.

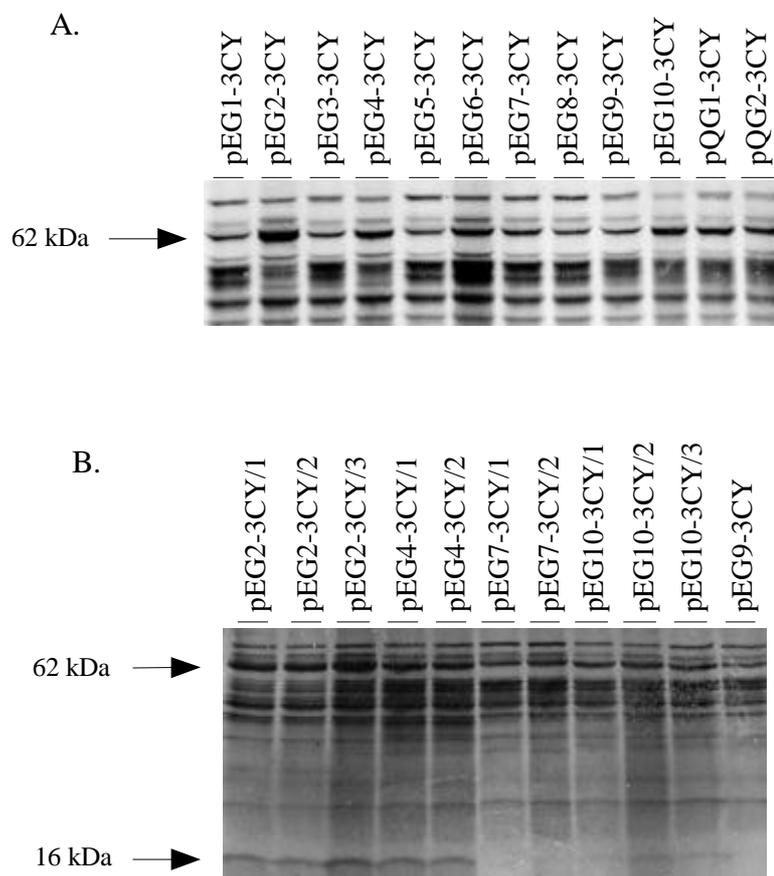


Figure 21 : Visualisation de l'activité protéolytique en *cis* de la protéase 3CY sur les différents dipeptides. Autoradiographie après séparation en gel SDS-page des produits radiomarqués obtenus par traduction en système TNT7-lysate de réticulocytes de lapin. Les puits sont identifiés par le nom des constructions utilisées pour les expériences de traduction *in vitro*. Plusieurs clones indépendants sont testés par construction. A gauche des autoradiographies sont indiquées les masses moléculaires estimées de la luciférase (62 kDa) et de la protéase 3CY (16 kDa). A. Gel à 10% en polyacrylamide. B. Gel à 15 % en polyacrylamide exposé 1 mois.

Les protéines obtenues par expression en système LRL des constructions pEG1-3CY, pEG2-3CY, pEG3-3CY, pEG4-3CY, pEG5-3CY, pEG6-3CY, pEG7-3CY, pEG8-3CY, pEG9-3CY, pEG10-3CY, pQG1-3CY et pQG2-3CY, ont été analysées en gel SDS-PAGE à 10% en polyacrylamide (Fig. 21A). Quelle que soit la construction utilisée, le profil électrophorétique révèle une bande d'environ 62 kDa. Cependant, l'élaboration de ces constructions a conduit à la présence d'un codon AUG en phase près de l'extrémité 3' du gène de la protéase (Fig. 11).

Ainsi, la taille estimée de la luciférase initiée à cet AUG interne serait de 64 kDa, taille compatible avec celle observée dans les pistes du gel. D'autant qu'une analyse plus attentive du profil électrophorétique révèle que l'expression des constructions pEG2-3CY et pEG4-3CY semble produire une bande de taille légèrement plus faible (62 kDa). Comme il semblait difficile de clairement différencier la bande luciférase due au clivage de celle due à l'initiation interne (62/64 kDa), pour vérifier la capacité de clivage de la protéase 3CY en *cis* sur les différents dipeptides étudiés nous avons essayé de détecter la présence de la protéase séparée de la protéine de fusion. Pour cela, les produits d'expression de différents clones de toutes les constructions sont analysés en gel SDS-PAGE de 15% en polyacrylamide, afin d'optimiser la visualisation de la bande de 16 kDa correspondant à la protéase 3CY. Seuls les profils obtenus pour les constructions pEG2-3CY, pEG4-3CY, pEG7-3CY, pEG10-3CY et pEG9-3CY sont montrés (Fig. 21B). Aucune bande à 16 kDa n'a pu être observée suite à l'expression de pEG1-3CY, pEG3-3CY, pEG5-3CY, pEG6-3CY, pEG7-3CY et pEG9-3CY. Les 2 clones pEG2-3CY et pEG4-3CY, pour qui une bande de 62 kDa était détectable sur le gel précédent, induisent sans ambiguïté la production d'une bande à 16 kDa. L'expression des clones pEG10-3CY entraîne une bande à 16 kDa de très faible intensité. Notons que les mesures d'activités luciférase après expression des différentes constructions en système LRL se sont révélées inexploitable du fait d'un bruit de fond trop élevé, ce qui est parfaitement corrélé à la présence du produit de traduction non spécifique de 64 kDa observés figure 21A.

Tableau 10 : Activités luciférase, liées à l'expression en système vvT7/RK13 des constructions pEG1-3CY, pEG2-3CY, pEG3-3CY, pEG4-3CY, pEG5-3CY, pEG6-3CY, pEG7-3CY, pEG8-3CY, pEG9-3CY, pEG10-3CY, pET-3CY, pQG1-3CY, pQG2-3CY et pBPLEG10 exprimées en pourcentage de l'activité luciférase liée à l'expression de pEG10-3CY ou pBPLEG10.

Constructions	Activités luciférase (%) [‡]	
	pEG10-3CY	pBPLEG10
pEG1-3CY	45	20±6
pEG2-3CY	238	103±15
pEG3-3CY	38	17±0
pEG4-3CY	181	79±11
pEG5-3CY	52	23±2
pEG6-3CY	47	21±1,5
pEG7-3CY	73	31±2
pEG8-3CY	43	19±0
pEG9-3CY	27	12±1
pEG10-3CY	100*	46±12
pET-3CY	27	11±3
pQG1-3CY	51	21±2
pQG2-3CY	27	11±0
pBPLEG10	227	100*

* Valeurs fixées arbitrairement à 100%

[‡] Les valeurs d'activité luciférase résultent de la moyenne des pourcentages calculés à partir de 2 essais réalisés avec 2 clones différents

Aussi, nous avons mesuré les activités luciférase obtenues après expression en système vvT7/RK13 des constructions pEG1-3CY, pEG2-3CY, pEG3-3CY, pEG4-3CY, pEG5-3CY, pEG6-3CY, pEG7-3CY, pEG8-3CY, pEG9-3CY, pEG10-3CY, pET-3CY, pQG1-3CY, pQG2-3CY et pBPLEG10. Les activités luciférase ont été rapportées à l'activité luciférase liée à

l'expression de pEG10-3CY ou de pBPLEG10 sous forme de pourcentage (Tab. 10). Les résultats calculés à partir de pEG10-3CY montrent pour pEG2-3CY et pEG4-3CY une activité luciférase très élevée 238 et 181%, pour pEG7-3CY une activité relativement faible 73% et pour pEG5-3CY, pEG6-3CY et pQG1-3CY une activité de 52, 47, et 51%. Ces 3 derniers résultats ne semblent pas différents des activités issues de l'expression des constructions pEG1-3CY, pEG3-3CY, pEG8-3CY, pEG9-3CY, pET-3CY et pQG2-3CY allant de 27 à 45%. Ces taux élevés d'activités luciférase pourraient refléter la faible efficacité de clivage de la protéase 3CY sur le site de référence, le site EG10. Aussi, pour une meilleure interprétation des résultats, il nous est apparu judicieux de calculer les pourcentages d'activité luciférase par rapport à l'activité luciférase liée à pBPLEG10 (Tab. 10). Les activités luciférase obtenues après expression des constructions pEG2-3CY et pEG4-3CY sont de 103 et 79% de l'activité luciférase liée à pBPLEG10 alors que les activités luciférase liées à pEG7-3CY et pEG10-3CY sont seulement de 31 et 46%. Les activités luciférase liées à l'expression de pEG1-3CY, pEG3-3CY, pEG5-3CY, pEG6-3CY, pEG8-3CY, pEG9-3CY, pET-3CY, pQG1-3CY et pQG2-3CY varient de 11 à 23%. On constate que l'activité protéolytique en *cis* de la protéase 3CY est faible. Par ailleurs, toutes les valeurs d'activité luciférase sont supérieures à 8%, valeur caractéristique du bruit de fond dans les expériences d'activité protéolytique en *cis* de la protéase 3CL. Cette observation suggère que la spécificité de clivage de la protéase courte soit plus faible que celle de la protéase 3CL. Par ailleurs, il semble important de noter qu'aucun nouveau site de maturation n'apparaît.

2.3. Délimitation de l'activité de la protéase 3C-like

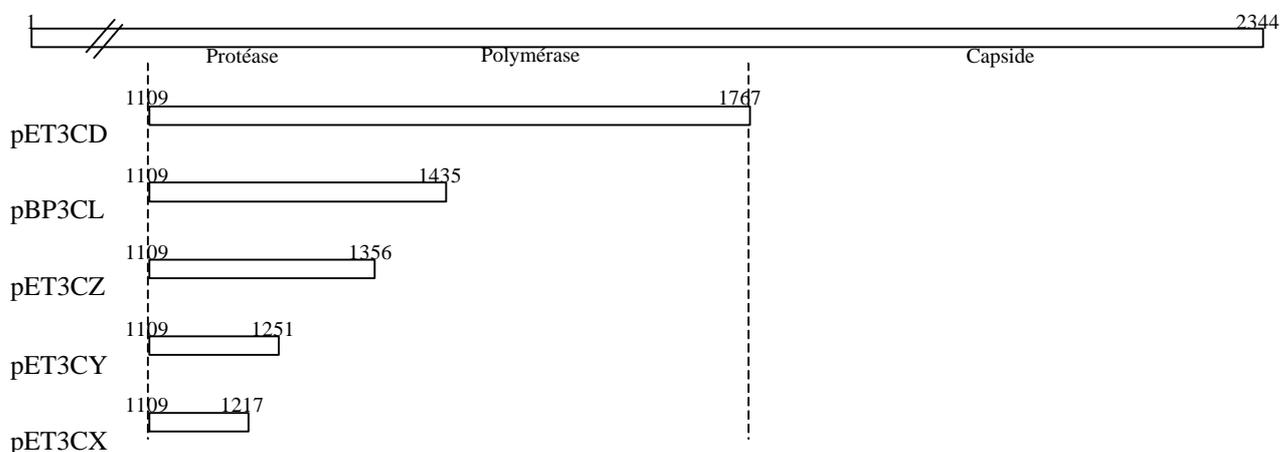


Figure 22 : Représentation schématique des fragments de la polyprotéine testés pour leur activité protéolytique, clonés dans des vecteurs d'expression (pET22B(+)) et pBSSK(-)). Leurs positions au sein de la polyprotéine sont indiquées. Le nom de la construction utilisée dans les expériences d'expression est spécifié devant chaque fragment.

La construction pEP1P2Q a été utilisée afin de visualiser les activités protéolytiques exprimées en *trans* des protéases 3CX, 3CY, 3CZ, 3CL et 3CD. Afin de définir la séquence minimale possédant encore la fonction protéase, nous avons réalisé des expériences de cotraduction en système LRL avec les constructions, pET3CX, pET3CY, pET3CZ, pBP3CL et pET3CD. Ces constructions comportent sous le promoteur T7 la séquence codant pour l'intermédiaire de maturation p72 (protéase-polymérase) plus ou moins délétée en son extrémité 3' (Fig. 22).

Toutes ces constructions comportent toujours l'information pour les acides aminés H-1135, D-1152 et C-1212 constituant le site catalytique de la protéase 3C-like (Boniotti *et al.*, 1994).

La construction pEP1P2Q présente sous le promoteur T7 la séquence codant pour une partie de la polyprotéine allant du codon 1 au codon 299 en fusion avec la séquence codant pour l'épitope 3b5 (Q). Cette construction permet d'exprimer en système LRL le polypeptide P1P2Q (Pour le détail de la construction et du procédé voir fig. 26B, § 2.4.) qui comporte le site EG2 que nous venons d'identifier. Nous avons fusionné la séquence codant pour l'épitope 3b5 à l'extrémité 3' du gène P1P2 car nous ne disposons pas au laboratoire d'Ac monoclonal anti-p16 ou -p26. Ainsi, par simple immunoprécipitation d'une bande de 18 kDa si EG2 est clivé ou de 36 kDa s'il ne l'est pas, il était possible de vérifier l'activité protéolytique en *trans* des différentes formes de la protéase sur ce site EG2.

Les produits d'expression obtenus en système LRL à partir de la construction pEP1P2Q seule ou coexprimée avec les constructions pET3CX, pET3CY, pET3CZ, pBPL3CL et pET3CD ont été immunoprécipités à l'aide de l'Ac monoclonal anti-3b5 puis analysés en gel SDS-PAGE à 12,5% en polyacrylamide (Fig. 23).

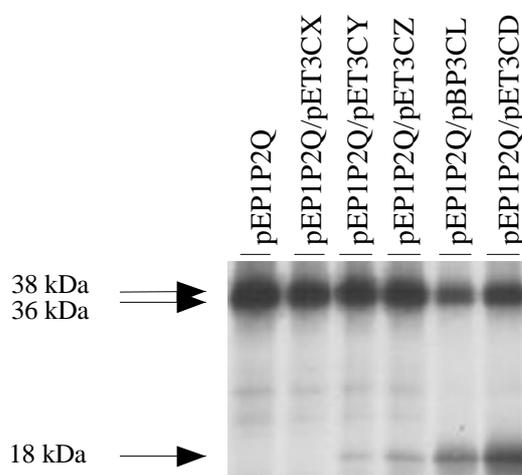


Figure 23 : Visualisation de l'activité protéolytique en *trans* des protéases 3CX, 3CY, 3CZ, 3CL et 3CD sur le site EG2. Les protéines sont obtenues par traduction en système TNT7-lysate de réticulocytes de lapin en présence de méthionine ³⁵S puis immunoprécipitées par l'Ac monoclonal anti-3b5. Les produits radiomarqués et immunoprécipités sont séparés en gel SDS-PAGE à 12,5% en polyacrylamide. Les constructions utilisées dans les expériences de traduction sont signalées au-dessus des puits. A gauche de l'autoradiographie sont spécifiées les masses moléculaires estimées des bandes majoritaires.

Le profil électrophorétique obtenu suite à l'immunoprécipitation des produits d'expression de la construction pEP1P2Q seule ou coexprimée avec pET3CX montre 2 bandes majoritaires de 38 et 36 kDa. Ces bandes correspondent aux produits d'expression initiés respectivement au premier et au second AUG. Par contre, le profil électrophorétique obtenu à partir des coexpressions de pEP1P2Q/pET3CY, pEP1P2Q/pET3CZ, pEP1P2Q/pBP3CL et pEP1P2Q/pET3CD montre une bande supplémentaire plus ou moins intense de 18 kDa. Cette bande supplémentaire témoigne du clivage du polypeptide P1P2Q au niveau du site EG2 (Fig. 26). Les polypeptides 3CY, 3CZ, 3CL et 3CD possèdent donc une activité protéolytique s'exprimant en *trans*. L'activité protéolytique semble liée à la longueur de la protéase, plus la taille de la protéase est grande, plus l'efficacité est importante. Il faut noter que le polypeptide

3CX, bien que comportant les 3 acides aminés du site catalytique, ne montre aucune activité protéolytique en *trans* décelable sur le site EG2.

2.4. Localisation de nouveaux sites de clivage par activité *trans* de la protéase

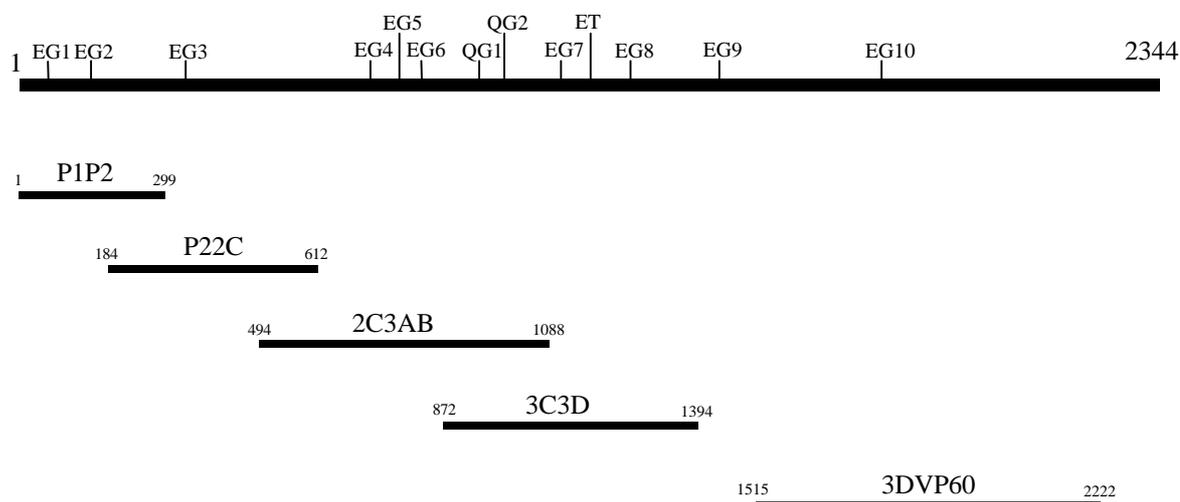


Figure 24 : Représentation schématique décrivant les polypeptides utilisés dans l'étude du clivage en *trans* des protéases 3CY, 3CL et 3CD. Au-dessus, est représentée la polyprotéine du RHDV avec les différents dipeptides d'intérêt. La localisation des polypeptides au sein de la polyprotéine est indiquée sous la polyprotéine.

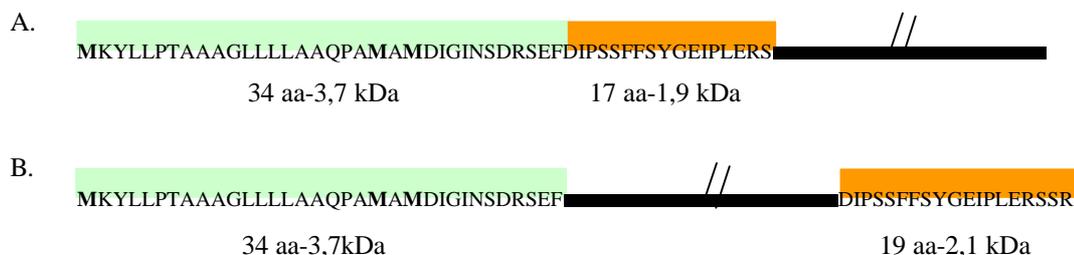


Figure 25 : Représentation schématique des 2 types de polypeptides utilisés dans cette étude. Les séquences peptidiques du peptide leader de pET22B(+) (en vert) et de l'épitope 3b5 (orange) sont indiquées. A. La séquence codante de l'épitope est située en 5' du gène d'intérêt. B. La séquence codante de l'épitope est située en 3' du gène d'intérêt. Les tailles en acides aminés et les masses en kDa du peptide leader et de l'épitope 3b5 sont indiquées. Les méthionines potentiellement responsables d'initiation interne sont soulignées.

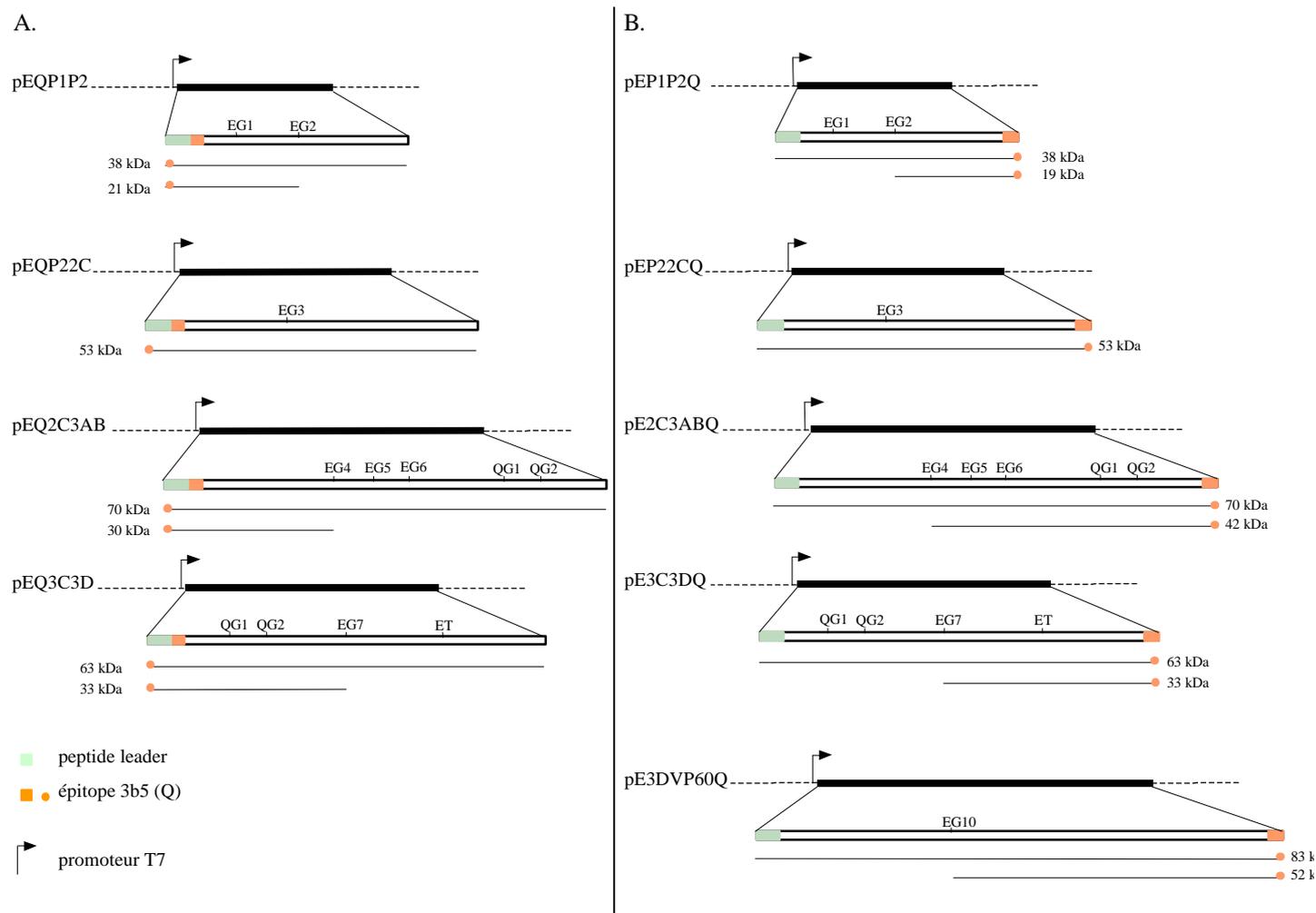


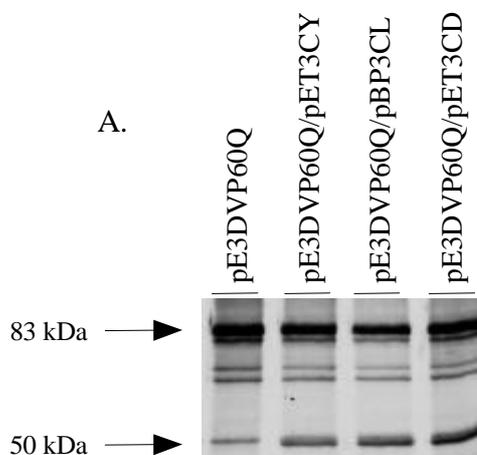
Figure 26 : Représentation schématique des constructions utilisées pour l'étude de l'activité protéolytique en *trans* de la protéase 3C-like. Les protéines observables en SDS-PAGE après traduction, maturation et immunoprécipitation sont représentées sous chaque construction, en tenant compte des sites déjà identifiés. A. constructions ayant la séquence codant pour l'épitope 3b5 en 5' du gène d'intérêt. B. constructions ayant la séquence codant pour l'épitope 3b5 en 3' du gène d'intérêt.

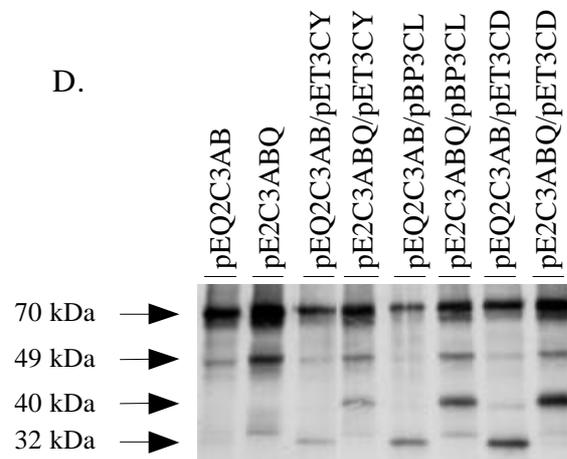
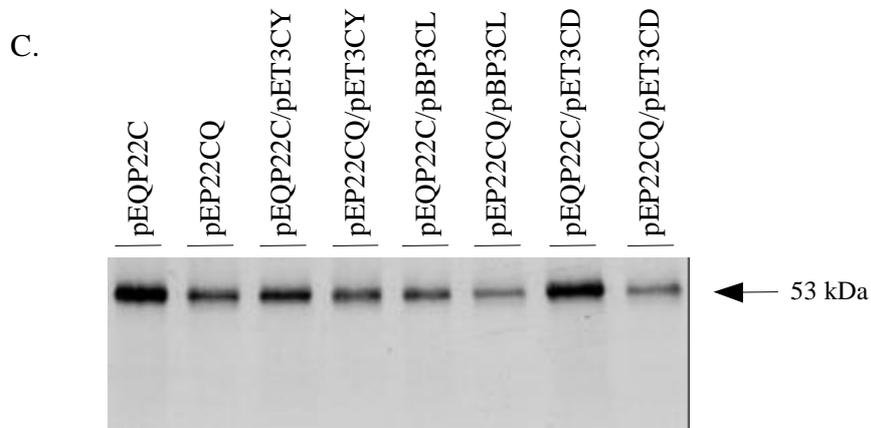
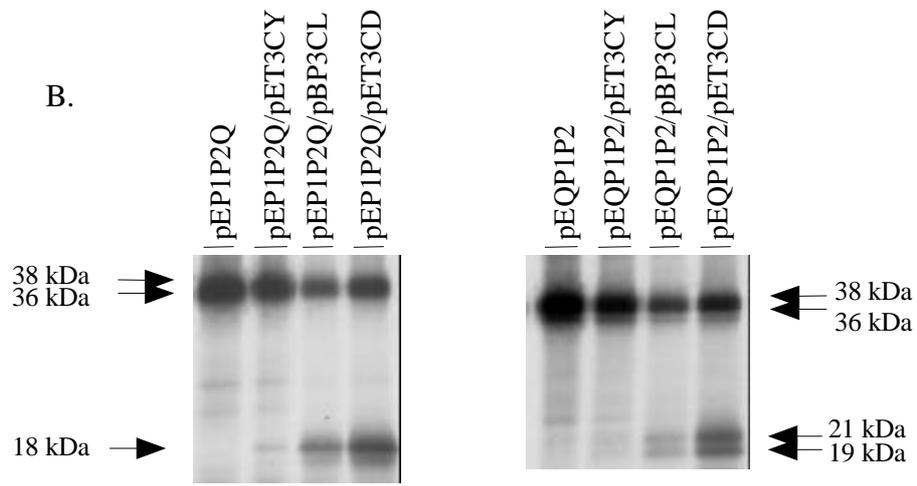
A ce point de nos recherches, il nous a semblé important de localiser de nouveaux sites potentiels de clivage par une technique permettant d'étudier le processus de clivage à partir de polypeptides couvrant la polyprotéine. La figure 24 localise sur la séquence de la polyprotéine les différentes régions polypeptidiques testées dans cette étude. Le polypeptide P1P2 contient la séquence peptidique de la polyprotéine comprise entre les acides aminés 1 et 299 avec notamment les dipeptides EG1 et EG2. Le polypeptide P22C contient la séquence comprise entre les acides aminés 184 et 612 dont le dipeptide EG3 situé à l'extrémité N-terminale de l'hélicase. Le polypeptide 2C3AB compris entre les acides aminés 494 et 1088 contient les dipeptides EG4, EG5, EG6, QG1 et QG2 dont l'extrémité N-terminale de la VPg. Le polypeptide 3C3D compris entre les acides aminés 872 et 1394 contient les dipeptides QG1, QG2, EG7 et ET. Enfin, le polypeptide 3DVP60 compris entre les acides aminés 1515 et 2222, a été choisi comme témoin recouvrant une région de la polyprotéine qui subit un seul et unique clivage au niveau du site EG10, clivage très bien décrit par différentes publications (Boniotto *et al.*, 1994, Martin Alonso *et al.*, 1996, Wirblich *et al.*, 1995, Wirblich *et al.*, 1996). Il est important

de remarquer que les polypeptides P1P2, P22C, 2C3AB et 3C3D recouvrent toute la partie de la polyprotéine où sont localisés les sites de maturation non identifiés.

Ainsi, pour étudier spécifiquement la capacité de clivage en *trans* des protéases 3CY, 3CL et 3CD (3 formes dont l'efficacité de clivage en *trans* a été démontrée) sur ces différents polypeptides, nous avons mis en place une nouvelle stratégie (brièvement décrite dans le paragraphe précédent). En effet, pour pallier à l'absence d'Ac spécifique reconnaissant les différentes régions de la polyprotéine, nous avons inséré en 5' ou en 3' des différentes régions la séquence Q codant pour l'épitope linéaire de la glycoprotéine S du TGEV (Virus de la gastro-entérite transmissible de porcelet) reconnu par l'Ac monoclonal 3b5 (Delmas *et al.*, 1990) (Fig. 25). De cette manière, nous avons établi 2 types de constructions. Les constructions pEQP1P2, pEQP22C, pEQ2C3AB et pEQ3C3D présentent l'épitope 3b5 à l'extrémité N-terminale de chaque protéine et les constructions pEP1P2Q, pEP22CQ, pE2C3ABQ, pE3C3DQ et pE3DVP60Q présentent l'épitope 3b5 à l'extrémité C-terminale de chaque protéine. Il est important de noter que le jeu des constructions entraîne lors des expériences d'expression l'obtention d'un produit de traduction dont la taille est augmentée d'environ 6 kDa par la présence du peptide leader et de l'épitope 3b5. Pour une meilleure compréhension des résultats, figure 26, nous avons présenté une schématisation des produits d'expression et de clivage attendus à partir des données établies jusque là dans nos recherches.

L'immunoprécipitation par l'Ac monoclonal anti-3b5 des produits d'expression ou de coexpression de toutes ces constructions est analysée en gel SDS-PAGE (Fig. 27).





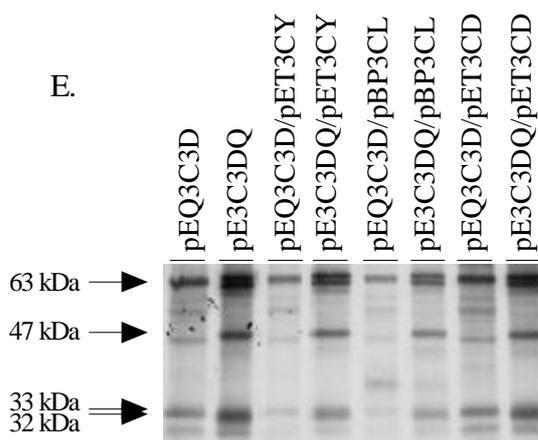


Figure 27 : Recherche de nouveaux sites de clivage en *trans* pour les formes 3CY, 3CL et 3CD de la protéase. Autoradiographie après séparation en gels SDS-PAGE des produits radiomarqués obtenus par traduction en système TNT7-lysate de réticulocytes de lapin puis immunoprécipités au moyen de l'Ac monoclonal 3b5. Les constructions utilisées dans les expériences de cotranscriptions sont indiquées au-dessus des puits. A droite ou à gauche des autoradiographies est signalée la masse moléculaire estimée des bandes majoritaires.

L'immunoprécipitation des produits d'expression de la construction pE3DVP60Q révèle une bande majoritaire de 83 kDa (Fig. 27A) correspondant à la taille attendue du polypeptide (Fig. 26B). L'immunoprécipitation des produits de coexpression de la construction pE3DVP60Q avec les constructions pET3CY, pBP3CL ou pET3CD révèle une bande supplémentaire de 50 kDa, témoin du clivage au site EG10.

L'immunoprécipitation des produits d'expression des constructions pEP1P2Q et pEQP1P2 révèlent 2 bandes de 36 et 38 kDa (Fig. 27B). Ces bandes correspondent aux produits d'expression initiés respectivement aux deuxième/troisième et premier AUG présents dans la séquence codante du peptide leader du vecteur pET22B(+) (Fig. 25). L'immunoprécipitation des produits de coexpression de la construction pEP1P2Q avec les constructions pET3CY, pBP3CL ou pET3CD révèle une bande supplémentaire de 18 kDa correspondant au produit de clivage au niveau du site EG2. L'immunoprécipitation des produits de coexpression de la construction pEQP1P2 avec les constructions pET3CY, pBP3CL ou pET3CD révèle 2 bandes supplémentaires de 21 et 19 kDa issues du clivage des polypeptides de 38 et 36 kDa au niveau du site EG2.

L'immunoprécipitation des produits d'expression des constructions pEQP22C et pEP22CQ ou de coexpression des mêmes constructions avec les constructions pET3CY, pBP3CL ou pET3CD révèle une seule et unique bande de 53 kDa (Fig. 27C). Cette bande correspond au produit d'expression attendu (Fig. 26). Aucun clivage n'est apparent que ce soit au niveau du dipeptide EG3 ou d'un autre dipeptide dans cette partie de la polyprotéine.

L'immunoprécipitation des produits d'expression des constructions pEQ2C3AB et pE2C3ABQ révèle une bande majoritaire de 70 kDa (Fig. 27D) qui correspond à la taille attendue du polypeptide (Fig. 26). La bande supplémentaire à 49 kDa observée lors de l'immunoprécipitation des produits d'expression de la construction pE2C3ABQ est probablement due à une initiation à un AUG interne. L'immunoprécipitation des produits de

coexpression des constructions pEQ2C3AB et pE2C3ABQ avec les constructions pET3CY, pBP3CL ou pET3CD révèle une bande supplémentaire de 32 kDa dans le cas de pEQ2C3AB et de 40 kDa dans le cas de pE2C3ABQ. Selon toute vraisemblance, ces bandes correspondent aux produits de maturation issus du clivage du polypeptide 2C3AB au niveau du site EG4. Dans l'hypothèse d'un clivage au niveau du dipeptide QG1, on observerait une bande supplémentaire de 18 kDa dans le cas de pE2C3ABQ. De même, le clivage au niveau du dipeptide QG2 induirait une bande de 12 kDa non visualisable dans notre expérience.

L'immunoprécipitation des produits d'expression de la construction pEQ3C3D ou de coexpression de la même construction avec les constructions pET3CY, pBP3CL ou pET3CD donne un profil protéique identique avec 2 bandes de 63 et 33 kDa (Fig. 27E). La bande à 63 kDa correspond à la taille attendue du polypeptide. La bande à 33 kDa correspond au produit de maturation par clivage du site EG7 (Fig. 26A). De même, l'immunoprécipitation des produits d'expression de la construction pE3C3DQ ou de coexpression de la même construction avec les constructions pET3CY, pBP3CL et pET3CD donne un profil protéique identique avec 3 bandes de 63, 47 et 32 kDa (Fig. 27E). La bande de 63 kDa correspond à la taille attendue du polypeptide. La bande de 32 kDa correspond au produit de maturation par clivage du site EG7 (Fig. 27E). La bande supplémentaire de 47 kDa peut s'expliquer soit par une initiation de traduction à un AUG interne soit par un clivage à un site situé entre QG1 et QG2. Nous privilégions la première hypothèse car nous n'observons pas de bande à 22 kDa lors de l'expression de la construction réciproque (pEQ3C3D). Aucune bande de 18 kDa témoignant d'un clivage au niveau du dipeptide ET n'est observée. L'activité autocatalytique exprimée par le polypeptide 3C3D vient du fait qu'il possède toute l'information nécessaire à une activité protéolytique.

L'ensemble de ces résultats confirme les sites de clivage EG2, EG4, EG7 et EG10 sans pour autant en révéler de supplémentaire.

2.5. Effet de la complémentation sur l'efficacité de clivage

Nous avons envisagé la possibilité que la protéase 3C-like puisse montrer une efficacité et une spécificité de clivage différente suivant l'expression de son activité en *cis* ou en *trans*. Nous avons donc mesuré l'activité luciférase liée à la coexpression en système LRL des constructions pBPLEG1, pBPLEG2, pBPLEG3, pBPLEG4, pBPLEG5, pBPLEG6, pBPLEG7, pBPLEG8, pBPLEG9, pBPLEG10, pBPLET, pBPLQG1 et pBPLQG2 avec la construction pET3CY ou pBP3CL ou encore pET3CD (Tab. 11, Fig. 28).

Dès à présent, il est important de noter que cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois. Cependant, la vue d'ensemble des résultats offerte par la figure 29 montre que l'expression de l'activité protéolytique en *trans* n'entraîne pas la mise en évidence de nouveau site de clivage. Toutefois, dans une vision plus fine, une différence d'efficacité de clivage apparaît en fonction de la protéase 3CY, 3CL ou 3CD coexprimée.

Ainsi, l'activité luciférase obtenue après coexpression de la construction pBPLEG2 avec pET3CD est de 152% de l'activité de pBPLEG10 avec pET3CD. Ces résultats suggèreraient que la présence de la protéase 3CD permet d'augmenter le clivage au niveau du site EG2.

De même, la présence de la protéase 3CY semblerait augmenter l'efficacité de clivage au niveau des sites EG2 et EG5. En effet, l'activité luciférase liée à la coexpression des constructions pBPLEG2 et pBPLEG5 avec la construction pET3CY est de 142% et de 63% de l'activité luciférase liée à la coexpression de pBPLEG10 avec pET3CY.

Enfin, les activités luciférase obtenues après coexpression des constructions pBPLEG1, pBPLEG3, pBPLEG5, pBPLEG6, pBPLEG8, pBPLEG9, pBPLET, pBPLQG1 et pBPLQG2 avec pET3CL sont majoritairement inférieures à l'activité luciférase obtenue après expression de ces mêmes constructions sans pET3CL. Ces résultats peuvent s'expliquer par une augmentation de l'efficacité de clivage au niveau du site EG10 en présence de la protéase 3CL.

Notons qu'il faudrait répéter l'expérience plusieurs fois dans le but de rendre les résultats robustes pour pouvoir donner plus de poids à ces nuances.

Tableau 11 : Activités luciférase obtenues après expression en système LRL des constructions pBPLEG1 à 10, pBPLET, pBPLQG1 et pBPLQG2 seules ou avec les constructions pET3CY, pET3CL ou pET3CD.

Constructions	Activités luciférase (%) [‡]			
	-	pET3CY	pBP3CL	pET3CD
pBPLEG1	33	30	18	24
pBPLEG2	102	142	105	152
pBPLEG3	51	44	29	42
pBPLEG4	108	98	92	120
pBPLEG5	54	63	38	55
pBPLEG6	38	41	29	35
pBPLEG7	98	87	80	101
pBPLEG8	38	32	25	31
pBPLEG9	24	26	14	17
pBPLEG10	100*	100*	100*	100*
pBPLET	41	33	27	26
pBPLQG1	41	37	22	26
pBPLQG2	30	30	23	15

* L'activité luciférase de pBPLEG10, choisie comme référence, est fixée à 100%

[‡] Les valeurs d'activité luciférase résultent de la moyenne des pourcentages calculés à partir d'un essai

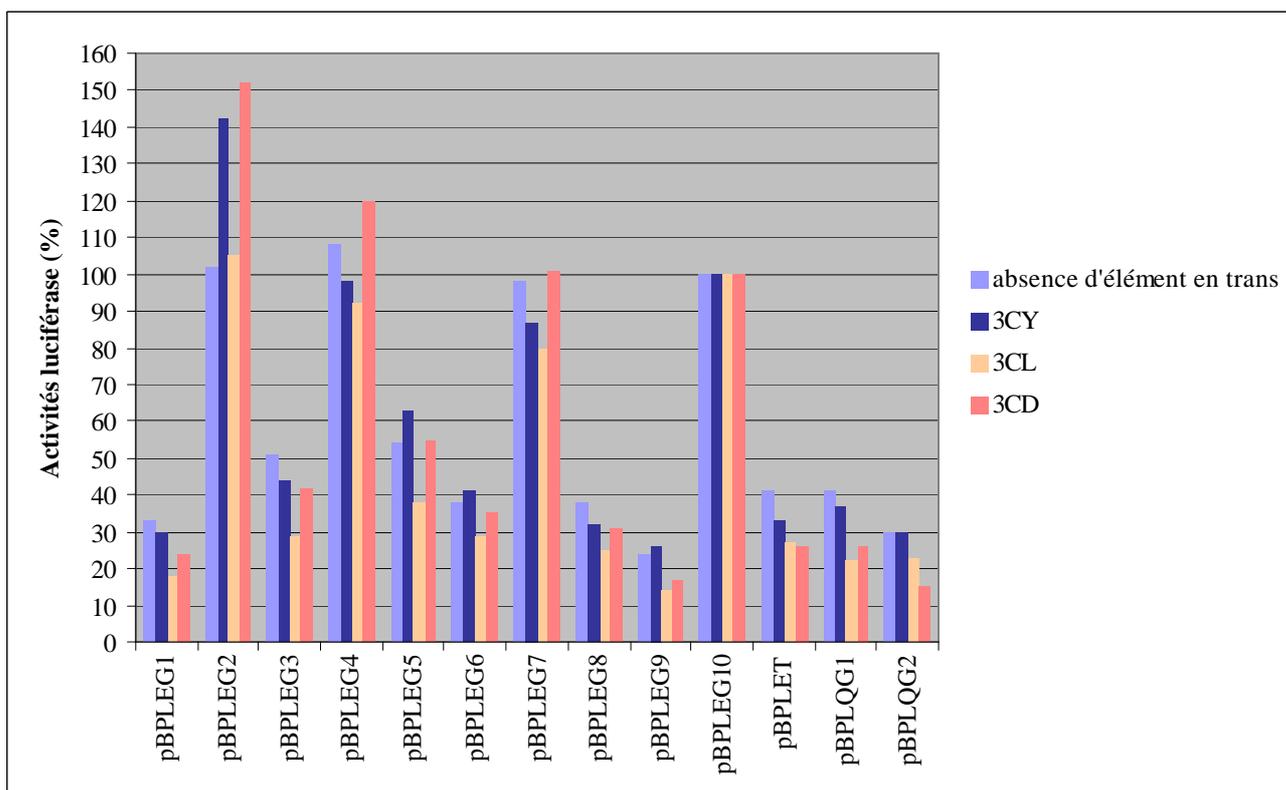


Figure 28 : Histogramme récapitulatif des activités luciférase obtenues après expression en système LRL des constructions pBPLEG1 à 10, pBPLET, pBPLQG1 et pBPLQG2 seules ou avec les constructions pET3CY, pBP3CL et pET3CD. Les activités luciférase sont rapportées en pourcentage de celle de pBPLEG10 dans chaque essai.

2.6. Mutagenèse aléatoire sur le dipeptide EG2 (143-144)

Tableau 12 : Activités luciférase obtenues après expression en système LRL des constructions obtenues par mutagenèse dirigée aléatoire de pBPLEG2

Constructions	Activités luciférase (%) [‡]	Nature du dipeptide	Constructions	Activités luciférase (%) [‡]	Nature du dipeptide
pBPLXXA17	26	IH	pBPLXXH7	49	HA
pBPLXXA21	24	QF	pBPLXXH11	30	CA
pBPLXXA32	21	KA	pBPLXXH14	29	AC
pBPLXXC20	32	YY	pBPLXXH28	39	TL
pBPLXXC23	28	QI	pBPLXXI1	45	HW
pBPLXXC36	37	HR	pBPLXXI18	54	RP
pBPLXXD2	31	VP	pBPLXXI23	44	KG
pBPLXXD5	41	AS	pBPLXXI39	55	RP
pBPLXXD20	33	QP	pBPLXXJ2	47	QR
pBPLXXD24	45	NH	pBPLXXJ7	31	FL
pBPLXXD46	36	CC	pBPLXXJ21	48	RY
pBPLXXF3	45	MR	pBPLXXJ28	58	GV
pBPLXXF11	51	NV	pBPLXXJ31	22	CR
pBPLXXF14	45	NG	pBPLXXJ34	12	MAUVAIS
pBPLXXF20	44	CS	pBPLXXJ37	0,1	STOP/OPALE
pBPLXXF22	51	GS	pBPLXXJ43	15	MAUVAIS
pBPLXXF25	49	LP	pBPLXXK21	46	GI
pBPLXXF36	44	LG	pBPLXXK29	61	QS
pBPLXXG10	35	TI	pBPLXXK39	44	HP
pBPLXXG32	53	QA	pBPLXXK40	0,1	STOP/AMBRE
pBPLXXG33	42	QL	pBPLXXK47	59	SA
pBPLXXG34	40	RR	pBPLEG2	100*	EG

* L'activité luciférase de pBPLEG2, choisie comme référence, est fixée à 100%

[‡] Les valeurs d'activité luciférase résultent de la moyenne des pourcentages calculés à partir d'un essai

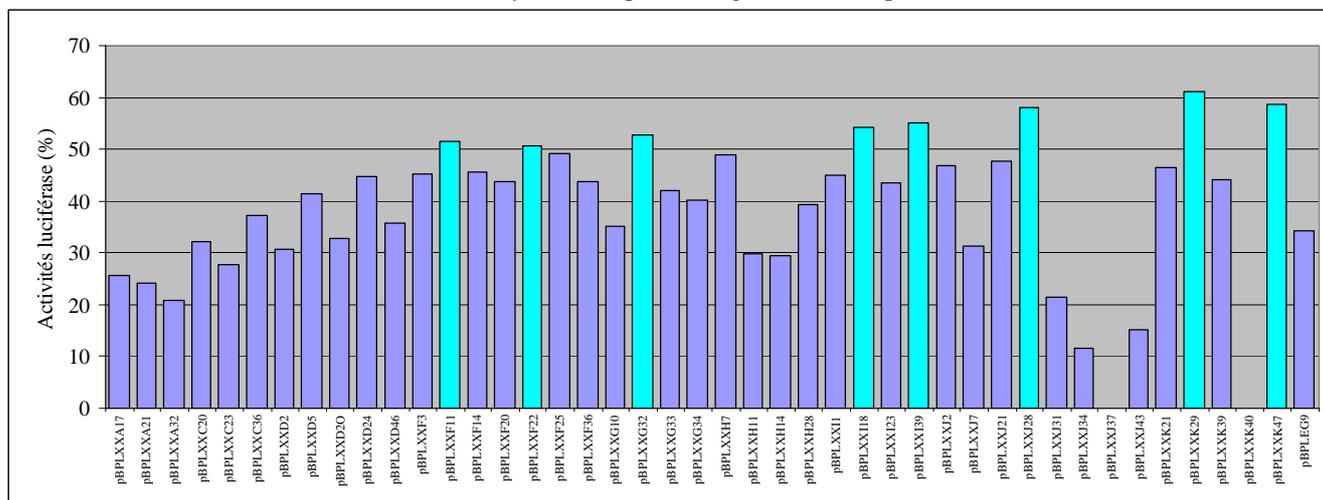


Figure 29 : Histogramme récapitulatif des activités luciférase obtenues après expression en système LRL des constructions obtenues par mutagenèse dirigée aléatoire de pBPLEG2. Les activités luciférase sont rapportées en pourcentage de celle de pBPLEG2.

Dans un souci d'identification de nouveaux dipeptides pouvant être clivés par la protéase 3C-like, nous avons procédé à une mutagenèse aléatoire du dipeptide EG2 au sein de la construction pBPLEG2. Il a été, ainsi, obtenu 43 constructions différentes où l'on trouve à la

jonction des gènes de la protéase 3CL et de la luciférase la séquence codant pour des dipeptides de natures très diverses installés dans le même environnement que le site EG2. Parmi ces constructions, 4 ont, par leur particularité, servi de témoins négatifs : les constructions pBPLXXJ34 et pBPLXXJ43 présentant à la jonction des gènes de la protéase et de la luciférase une base surnuméraire qui induit un saut de phase et les constructions pBPLXXJ37 et pBPLXXK40 présentant à la jonction des 2 gènes un codon stop. Les activités luciférase liées à l'expression dans le système LRL de toutes les constructions sont rapportées en pourcentage de l'activité luciférase liée à pBPLEG2. La gamme des activités luciférase obtenues s'étend de 0,1 à 61% (Tab. 12, Fig. 29). L'étude de l'efficacité de clivage sur les différents dipeptides EG présents le long de la polyprotéine a permis de définir que 50% d'activité luciférase exprimée en système LRL étaient significativement supérieurs au bruit de fond induit par ce système (cf. § 2). Comme attendu, l'expression des constructions pBPLXXJ37 et pBPLXXK40 ne permet pas d'activité luciférase et l'expression des constructions pBPLXXJ34 et pBPLXXJ43 induit une activité luciférase très faible, 12 et 15%. Ces résultats sont donnés à titre indicatif car ils ne sont pas exhaustifs et ils sont issus d'un seul et unique essai. Mais, il semblerait que pour 6 constructions, pBPLXXF11, pBPLXXF22, pBPLXXG32, pBPLXXI18, pBPLXXI39, pBPLXXJ28, pBPLXXK29 et pBPLXXK47, l'activité luciférase liée à leur expression soit supérieure à 50%, (limite de signification définie § 1). Ces constructions correspondent aux dipeptides QS, QA, RP, NV, SA, GV et GS.

3. MATURATION DE LA POLYPROTÉINE DU RHDV

3.1. Etude cinétique de la maturation de la polyprotéine

Nous avons réalisé une étude de la maturation de la polyprotéine du RHDV dans le système LRL. Pour cela, nous avons utilisé pour générer la polyprotéine la construction pUGG10. Cette construction est issue des banques d'ADNc du génome du RHDV-SD (Rasschaert *et al.*, 1995) réalisées au laboratoire. Elle correspond à la reconstruction du génome complet de la souche virale RHDV-SD sous promoteur T7. Dans un premier temps, nous avons procédé à une étude cinétique de la maturation de la polyprotéine. La cinétique de maturation est réalisée par 3 prélèvements d'une fraction aliquote du milieu réactionnel à des temps de 30 min, 1h et 3h. Ces fractions sont ensuite déposées sur gel SDS-PAGE en gradient de concentration 5-20% en polyacrylamide (Fig. 30). Il semble important de préciser que, la taille des bandes étant estimée à partir du marqueur 624 (Amersham), toutes les masses moléculaires indiquées supérieures à 97 kDa sont très peu précises. Au bout de 30 min d'incubation, l'expression de la construction pUGG10 conduit à quelques rares bandes discrètes. Au bout d'1h d'incubation, apparaissent de nombreuses bandes allant de 17 kDa à 250 kDa. Après 3h d'incubation, le profil se précise avec la disparition des bandes de 250 et 150 kDa et l'intensification des bandes de plus faibles masses moléculaires, visibles après 1h. La bande de 250 kDa correspond à la polyprotéine. Le fait qu'elle soit visible à 1h d'incubation permet de dire que la maturation de la polyprotéine est un processus post-traductionnel et non cotraductionnel. De même, la disparition de cette bande à plus de 3h d'incubation dénote la rapidité du processus

de maturation. La bande évaluée à 150 kDa est aussi éphémère que la polyprotéine, il s'agit probablement d'un intermédiaire de maturation instable.

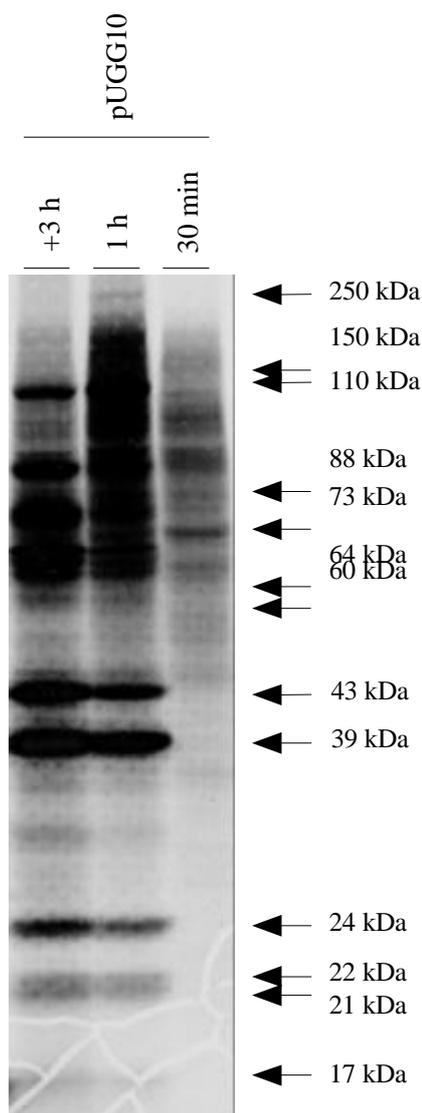


Figure 30 : Cinétique de la maturation de la polyprotéine du RHDV en système LRL. Autoradiographie après séparation en gels SDS-page en gradient de concentration (5-20% en polyacrylamide) des produits de traduction obtenus en système TNT7-lysate de réticulocytes de lapin en présence de méthionine ³⁵S. La masse moléculaire des bandes issues de la maturation de la polyprotéine, estimée à partir du marqueur 624 (Amersham), est indiquée à droite des autoradiographies.

3.2. Identification des intermédiaires de maturation comportant VP60 et 3D

Dans une tentative d'identification des différents produits générés par la maturation de la polyprotéine dans le système LRL, nous avons réalisé des expériences d'immunoprécipitation avec l'Ac monoclonal anti-VP60 (E3) et un sérum polyclonal anti-3D (Fig. 31). Les constructions pET3CD, pETVP60 et pET3D sont utilisées pour la réalisation de témoins d'expression et d'immunoprécipitation. La construction pETVP60 contient sous le promoteur T7 la séquence codant pour le gène de la protéine de capsid. La construction pET3D contient sous le promoteur T7 la séquence codant pour le gène de la polymérase compris entre le

codon 1252 (ET) et le codon 1767 (EG10) définie par Vasquez *et al.* (1998). Comme attendu, l'immunoprécipitation par le sérum polyclonal anti-3D des produits d'expression des constructions pET3CD et pET3D conduit respectivement à une bande majoritaire de 72 kDa et de 57 kDa et l'immunoprécipitation par l'Ac anti-VP60 des produits d'expression de la construction pETVP60 conduit à une bande majoritaire de 62 kDa.

L'immunoprécipitation par l'Ac monoclonal anti-VP60 des produits d'expression de la construction pUGG10, de même que pour pETVP60, ne révèle qu'une seule et unique bande de 62 kDa, ce qui tendrait à montrer que la protéine de capsid est rapidement libérée de la polyprotéine sans passer par un intermédiaire de maturation stable. Par ailleurs, l'immunoprécipitation par le sérum polyclonal anti-3D des produits d'expression de pUGG10 fait apparaître 3 bandes à 110 kDa, 88 kDa et 72 kDa. La bande de 72 kDa correspond à l'intermédiaire de maturation p72 qui comprend la protéase et la polymérase (3CD). Les bandes à 110 kDa et 88 kDa que l'on ne retrouve pas dans le profil obtenu après immunoprécipitation avec l'Ac anti-VP60 correspondraient à des intermédiaires de maturation stables en système LRL comprenant des protéines situées en N-terminal de la protéase : la p29 et la VPg (110 kDa) ou uniquement la VPg (88 kDa). Il est important de noter qu'aucune bande de 57 kDa ou de taille proche, qui correspondrait à la polymérase (3D) seule, n'est visible et que par conséquent dans cette expérience, la protéase et la polymérase ne semblent pas clivées.

En ce qui concerne les autres bandes révélées lors de l'expression de la construction pUGG10 (Fig. 30), nous n'avons pas d'autre sérum polyclonal ou Ac pour leur identification. Cependant, les bandes majoritaires de 64 kDa, 43 kDa et 17 kDa peuvent correspondre aux intermédiaires de maturation p65 et p41 et au polypeptide p16 décrivant, avec l'intermédiaire de maturation p72, la première étape de maturation (König *et al.*, 1998).

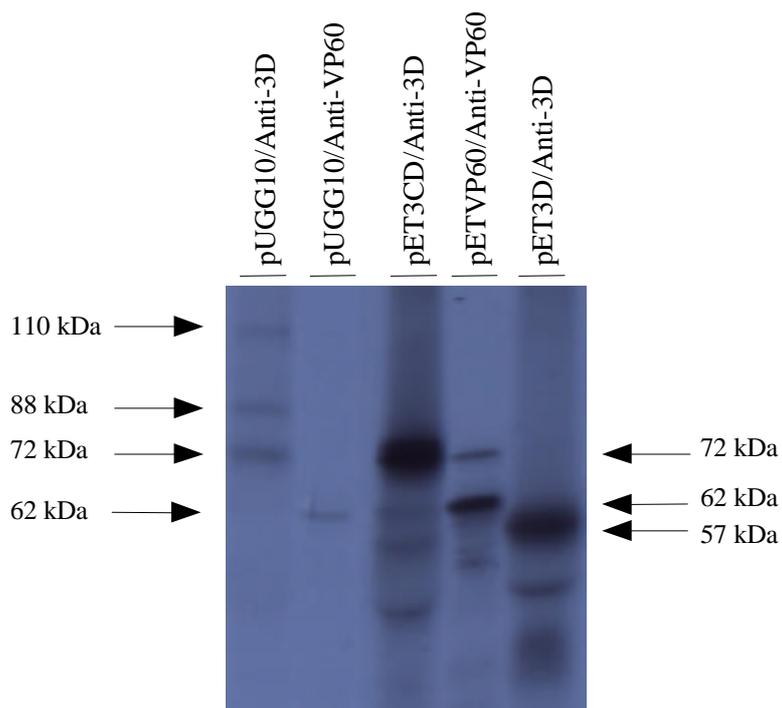


Figure 31 : Visualisation des polypeptides portant la polymérase (3D) et la protéine majeure de capsid (VP60). Immunoprécipitation des produits de traduction *in vitro* obtenus à partir des constructions pUGG10, pET3CD, pET3D et pETVP60 avec un sérum polyclonal anti-3D ou un Ac monoclonal anti-VP60. Au-dessus des puits sont signalés les constructions et l'Ac ou sérum utilisés lors des expériences d'immunoprécipitation. Les masses moléculaires des bandes estimées à partir du marqueur 624 (Amersham) sont spécifiées à droite et à gauche de l'autoradiographie.

3.3. Etude de la maturation de la polyprotéine en présence de la protéase 3CY ou 3CD

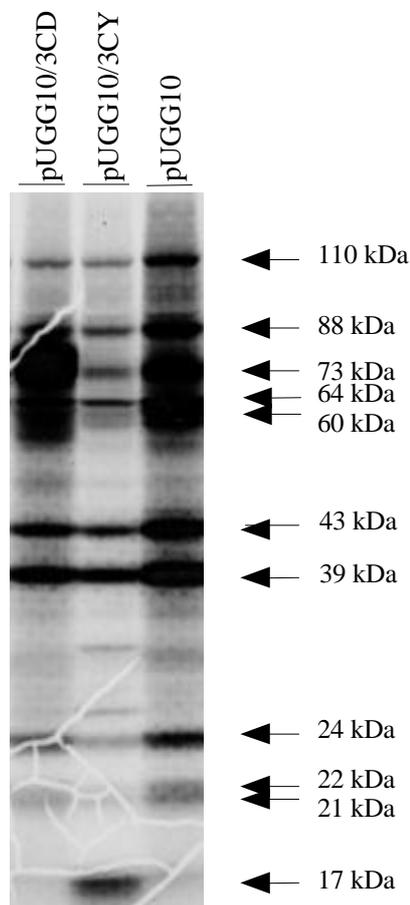


Figure 32 : Visualisation de la maturation de la polyprotéine du RHDV en présence des protéases 3CY ou 3CD. Autoradiographie après séparation en gel SDS-PAGE en gradient de concentration (5-20% en polyacrylamide) des produits de traduction obtenus en système TNT7-lysate de réticulocytes de lapin en présence de méthionine ^{35}S . Les constructions utilisées dans les expériences d'expression sont signalées au-dessus des puits. Les masses moléculaires des bandes majoritaires estimées à partir du marqueur 624 (Amersham) sont indiquées à droite de l'autoradiographie.

Etant donné que l'on ne décelait pas de clivage au niveau du site ET dans le système LRL, nous nous sommes interrogés sur l'influence de la présence en *trans* des protéases 3CY ou 3CD sur la maturation de la polyprotéine dans ce système.

Ainsi, le profil électrophorétique obtenu après coexpression de pUGG10 avec pET3CY ou pET3CD n'est pas différent du profil obtenu par expression de pUGG10 seule. Notons que les bandes surnuméraires sont dues à l'expression de la construction pET3CY ou de la construction pET3CD dans les essais correspondant (Fig. 32).

4. RECHERCHE DE COFACTEURS IMPLIQUÉS DANS LA MATURATION DE LA POLYPROTÉINE

Dans un même effort de recherche de nouveaux sites de clivage, nous avons envisagé la possibilité de l'influence de cofacteurs d'origines virale ou cellulaire sur l'efficacité et la spécificité de l'activité protéolytique de la protéase 3C-like, lors de 2 essais préliminaires.

4.1. Les cofacteurs d'origine virale :

Nous avons mesuré l'activité luciférase liée à la coexpression des constructions pBPLEG1, pBPLEG2, pBPLEG3, pBPLEG4, pBPLEG5, pBPLEG6, pBPLEG7, pBPLEG8, pBPLEG9, pBPLEG10, pBPLET, pBPLQG1 et pBPLQG2 avec les constructions pETP1, pETEG2-EG4, pETEG4-EG7 ou pET3CD dans le système LRL (Tab. 13). La construction pETP1 contient, sous le promoteur T7, la séquence codant pour l'intermédiaire de maturation p16 (P1). La construction pETEG2-EG4 contient, sous le promoteur T7, la séquence codant pour l'intermédiaire de maturation p65 (EG2-EG4). La construction pETEG4-EG7 contient, sous le promoteur T7, la séquence codant pour l'intermédiaire de maturation p41 (EG4-EG7).

Tableau 13 : Activités luciférase liées à l'expression en systèmes LRL et vvT7/RK13 des constructions pBPLEG1 à 10, pBPLET, pBPLQG1 et pBPLQG2 seules ou en présence des constructions pETP1, pETEG2-EG4, pETEG4-EG7, pET3CD ou pUGG10.

Constructions	Activités luciférase (%) [‡]							
	Constructions cotraduites	Lysat de réticulocytes				Vaccin T7		
		-	pETP1	pETEG2-EG4	pETEG4-EG7	pET3CD	-	pETEG4-EG7
pBPLEG1	37	24	24	25	24	3,4	6,7	12
pBPLEG2	102	91	78	109	152	133	137	152
pBPLEG3	51	40	33	42	42	19	18	32
pBPLEG4	108	72	72	77	120	170	83	130
pBPLEG5	54	43	45	49	55	15	22	7,9
pBPLEG6	41	27	30	34	35	10	11	10
pBPLEG7	98	69	64	80	101	139	95	122
pBPLEG8	38	31	32	32	31	9	7,5	6
pBPLEG9	24	11	13	14	17	3,9	4,3	6
pBPLEG10	100*	100*	100*	100*	100*	100*	100*	100*
pBPLET	41	23	25	27	26	4,8	7,5	18
pBPLQG1	41	22	26	26	26	0,7	8,4	7,9
pBPLQG2	30	18	16	17	15	2,2	5,7	7,3

* Valeurs fixées artificiellement à 100%

[‡] Les valeurs d'activité luciférase résultent de la moyenne des pourcentages calculés à partir d'un essai

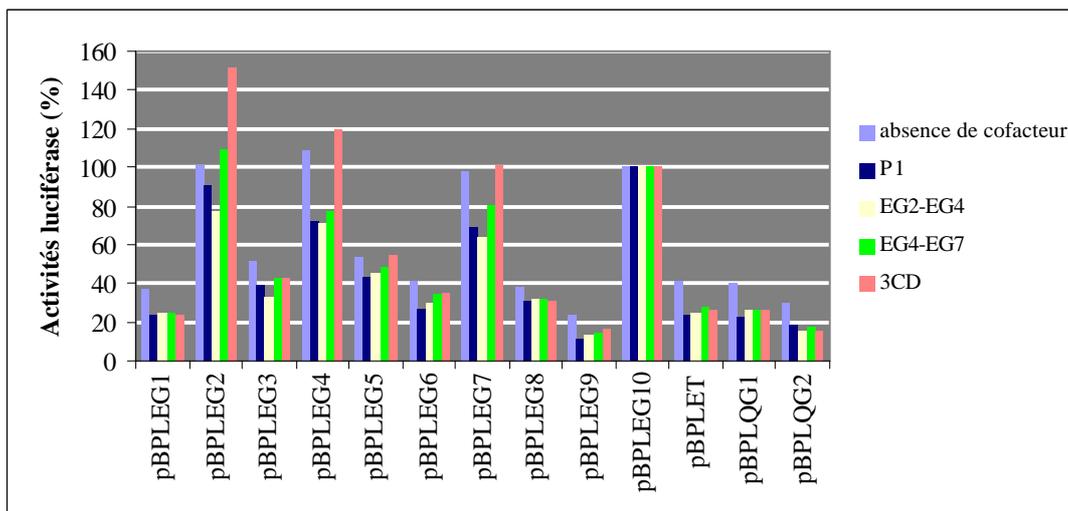


Figure 33 : Histogramme récapitulatif des activités luciférase liées à l'expression en système LRL des constructions pBPLEG1 à 10, pBPLET, pBPLQG1 et pBPLQG2 seules ou en présence des constructions pETP1, pETEG2-EG4, pETEG4-EG7 ou pET3CD. Les activités luciférase sont rapportées en pourcentage de celle de pBPLEG10 dans chacune des expériences de coexpression.

La vue d'ensemble, offerte par la figure 33, nous permet de constater qu'aucun nouveau site de coupure n'est apparent parmi les dipeptides testés. Cependant, bien que ces résultats soient issus d'un seul essai et manquent donc de robustesse, on peut remarquer de faibles différences d'efficacité de clivage en *cis* de la part de la protéase 3CL.

Les activités luciférase liées à la coexpression des constructions avec pETP1 ou pETEG2-EG4 sont plus faibles en comparaison des activités luciférase liées à l'expression des constructions seules, ce qui semblerait indiquer que le clivage en *cis* au niveau du site EG10 serait plus efficace en présence des polypeptides p16 et p65 .

Les activités luciférase liées à l'expression de la construction pBPLEG2 seule ou en présence de la construction pETEG4-EG7 sont équivalentes (102 versus 109%) alors que les activités luciférase liées à la coexpression des autres constructions d'intérêt avec pETEG4-EG7 sont plus faibles (Tab. 13). Le polypeptide p41 semblerait avoir un effet stimulateur sur le clivage en *cis* des sites EG2 et EG10.

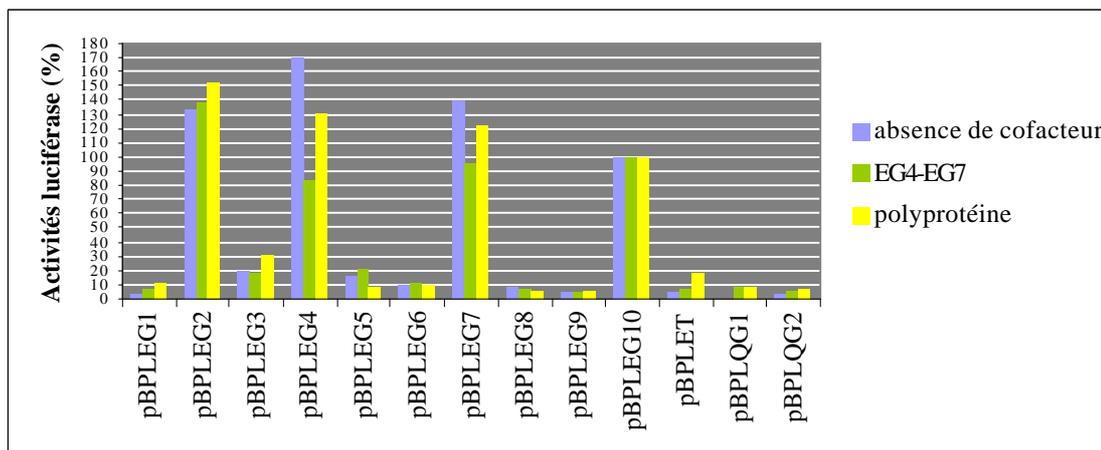


Figure 34 : Histogramme récapitulatif des activités luciférase obtenues après expression en système vvT7/RK13 des constructions pBPLEG1 à 10, pBPLET, pBPLQG1 et pBPLQG2 seules ou en présence des constructions pETEG4-EG7 et pUGG10. Les activités luciférase sont rapportées en pourcentage de celle de pBPLEG10 dans chacune des expériences de cotransfection.

Pour recouper les informations sur la nécessité de cofacteurs d'origine viraux, nous avons mesuré l'activité luciférase issue de la coexpression dans le système vvT7/RK13 des constructions pBPLEG1 à EG10, pBPLET, pBPLQG1 et pBPLQG2 avec les constructions pETEG4-EG7 ou pUGG10 (Tab. 13, Fig. 34). Nous rappelons que la construction pUGG10 permet l'expression complète de la polyprotéine.

La vue d'ensemble présentée par la figure 34 montre qu'il n'y a pas de nouveau site mis en évidence par cette expérience. Toutefois, quelques variations peuvent être soulignées bien que ces résultats soient issus d'un seul et unique essai.

En effet, on constate que l'activité luciférase obtenue après coexpression des constructions pBPLEG4 et pBPLEG7 avec pETEG4EG7 diminue notablement par rapport à l'activité luciférase obtenue après expression seule de pBPLEG4 et pBPLEG7 (83 versus 170% et 95 versus 139%). La présence de l'intermédiaire de maturation p41 montrerait un effet inhibiteur sur le clivage en *cis* au niveau des sites EG4 et EG7.

De même, l'activité luciférase liée à la coexpression avec pUGG10 de pBPLEG3 et pBPLET augmente notablement en comparaison de l'activité luciférase obtenue après expression seule de ces mêmes constructions (32 versus 19% et 18 versus 4,8%). La présence de la polyprotéine permettrait une augmentation du clivage en *cis* au niveau du site EG3 et un léger clivage au niveau du site ET.

4.2. Les cofacteurs d'origine cellulaire :

Nous avons mesuré l'activité luciférase issue de l'expression des constructions pBPLEG1 à EG10, pBPLET, pBPLQG1 et pBPLQG2 en présence d'extraits cellulaires dans le système LRL (Tab. 14). Les extraits cellulaires sont obtenus à partir des lignées cellulaires LMH et RK13. La lignée LMH est une lignée établie à partir d'un carcinome hépatique induit chez le poulet.

Sur l'histogramme réalisé à partir des résultats issus d'un seul et unique test (Fig. 35), nous pouvons constater l'absence de nouveau site de clivage. L'activité luciférase liée à l'expression

en système LRL en présence de l'extrait LMH de pBPLEG2, pBPLEG4 et pBPLEG7 est augmentée (123 versus 102, 129 versus 108 et 119 versus 98%) alors que pour l'activité luciférase des autres constructions d'intérêt, aucun effet n'est observé.

L'activité luciférase liée à l'expression en présence de l'extrait RK13 de pBPLEG2 et pBPLEG7 montre une chute relativement importante (76 versus 102% et 66 versus 98%) alors que l'activité luciférase liée à pBPLEG4 reste équivalente.

L'ensemble de ces résultats semble montrer que l'extrait cellulaire LMH augmenterait l'efficacité de clivage en *cis* de la part de la protéase 3CL au niveau des sites EG2, EG4 et EG7 alors que l'extrait cellulaire RK13 diminuerait l'efficacité de clivage au niveau des sites EG2 et EG7. Cependant, il est important de préciser que les mesures en RLU d'activité luciférase issue de l'expression en présence de l'extrait de cellules RK13 étaient exceptionnellement faibles. Cet extrait induirait une inhibition de la traduction dans le système LRL.

Tableau 14 : Effets de cofacteurs cellulaires sur l'activité protéolytique en *cis* de la protéase 3CL

Constructions	Activités luciférase (%)	
	LMH	RK13
pBPLEG1	33	16
pBPLEG2	102	76
pBPLEG3	51	42
pBPLEG4	108	109
pBPLEG5	54	43
pBPLEG6	38	31
pBPLEG7	98	66
pBPLEG8	38	31
pBPLEG9	24	21
pBPLEG10	100*	100*
pBPLET	41	33
pBPLQG1	41	29
pBPLQG2	30	28

*Valeurs fixées artificiellement à 100%

‡ Les valeurs d'activité luciférase résultent de la moyenne des pourcentages calculés à partir d'un essai

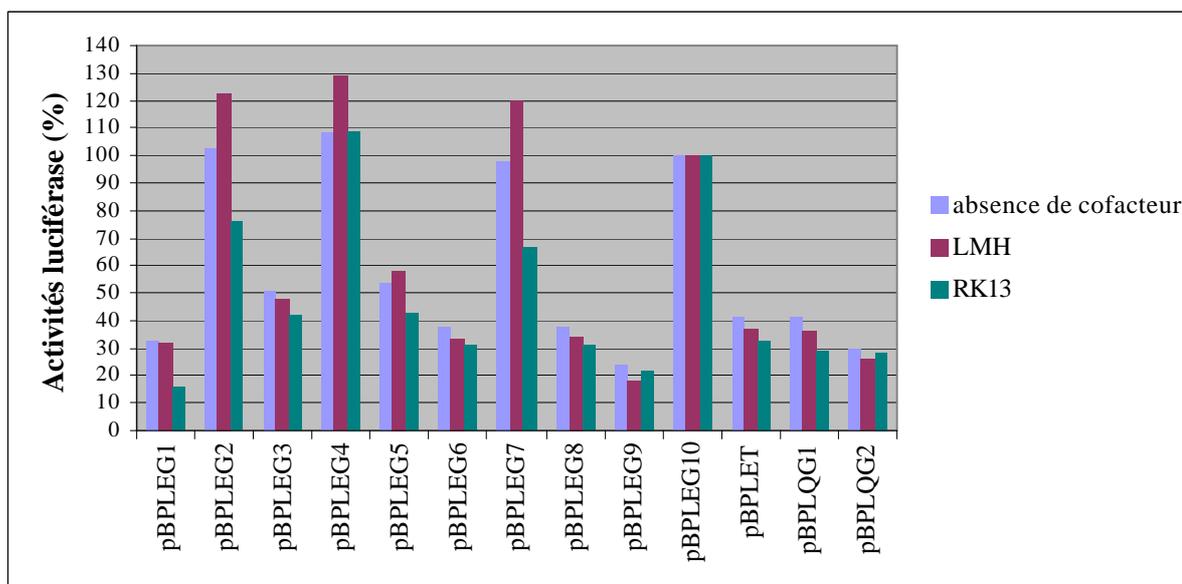


Figure 35 : Histogramme récapitulatif des activités luciférase obtenues après expression en système LRL des constructions pBPEG1 à 10, pBPLET, pBPLQG1 et pBPLQG2 en présence ou non d'extraits de cellules RK13 ou LMH. Les activités luciférase sont rapportées en pourcentage de celle de pBPEG10 dans chaque essai.

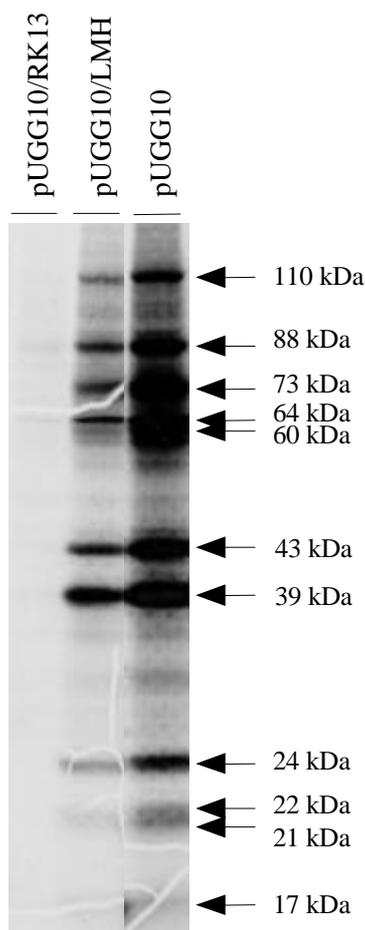


Figure 36 : Visualisation de l'autocatalyse de la polyprotéine du RHDV en présence de cofacteurs. Autoradiographie après séparation en gel SDS-PAGE en gradient de concentration (5-20% en polyacrylamide) des produits de traduction obtenus en système TNT7-lysate de réticulocytes de lapin en présence de méthionine ^{35}S . Au-dessus sont signalés les constructions et extraits cellulaires utilisés dans les expériences d'expression. A droite de l'autoradiographie sont indiquées les masses moléculaires des bandes majoritaires estimées à partir du marqueur 624 (Amersham).

Dans le même esprit, nous avons réalisé l'expression de la construction pUGG10 en présence d'extraits cellulaires RK13 ou LMH dans le système LRL. Les produits d'expression ont été analysés en gel SDS-PAGE en gradient de concentration (5-20% en polyacrylamide) (Fig. 36).

En présence de l'extrait cellulaire RK13, les bandes sont peu intenses témoignant d'une inhibition de la traduction dans le système eucaryote acellulaire.

En présence de l'extrait cellulaire LMH, le profil protéique se trouve inchangé.

Ces 6 dernières années, du fait de l'absence d'un système de culture cellulaire adapté pour la multiplication du RHDV, les études menées pour définir les mécanismes de maturation de la polyprotéine du virus RHDV, ont été abordées soit dans un système bactérien, soit dans un système eucaryote acellulaire (Boniotti *et al.*, 1994, Martin Alonso *et al.*, 1996, Wirblich *et al.*, 1995, Wirblich *et al.*, 1996). Ces études ont permis d'une part de déterminer la présence au sein de la polyprotéine d'une protéase analogue à la protéase à cystéine des picornavirus (Boniotti *et al.*, 1994) et d'autre part l'identification de 4 sites de maturation de la polyprotéine par cette protéase (Martin Alonso *et al.*, 1996, Wirblich *et al.*, 1995). Les sites EG4 (718-719) et EG7 (1108-1109) ont été identifiés par séquençage N-terminal dans un système eucaryote acellulaire, le site EG10 (1767-1768) par mutagenèse dirigée dans un système eucaryote acellulaire et le site ET (1251-1252) par séquençage N-terminal dans un système bactérien.

Etant donnée la difficulté à mettre en place un système réplcatif du RHDV en culture de cellules, nous avons élaboré une nouvelle technique originale, et d'utilisation simple, pour étudier la maturation de la polyprotéine du RHDV. Le principe de cette technique repose sur l'utilisation de la luciférase pour évaluer l'activité de la protéase 3C-like sur différents sites potentiellement clivables. Cette technique a consisté en la réalisation de constructions contenant sous le promoteur T7 le gène de la protéase 3CL (compris entre les codons 1109 et 1435) en fusion avec le gène de la luciférase. Une région cassette a été introduite à la jonction des 2 gènes, rendant aisée l'insertion des séquences oligonucléotidiques codant pour les octapeptides étudiés au cours du travail de thèse (Fig. 11). Ces constructions ont été utilisées dans 2 systèmes d'expression différents : un système eucaryote acellulaire (TNT7/lysate de réticulocytes de lapin) et un système eucaryote cellulaire permettant des conditions d'étude plus proches des conditions *in vivo* (vaccin T7/cellules de reins de lapin RK13).

Le début du travail a été logiquement consacré à la mise en place et à la validation de la technique. Dans un premier temps, nous avons élaboré les constructions pBPLEG10, pBPL10, pBPLEG10_{KO} et pBPL11. La construction pBPLEG10 permettait la production d'une protéine de fusion constituée de la protéase, du site EG10 et de la luciférase alors que les 3 autres constructions permettaient la production d'une protéine de fusion qui était mutée soit sur le site actif de la protéase (pBPLEG10_{KO}) soit sur le site de clivage (pBPL10 et pBPL11). Quel que soit le système d'expression utilisé, l'activité luciférase mesurée était parfaitement corrélée avec l'efficacité de clivage de la protéine de fusion observée sur gel par la libération de la protéase et de la luciférase (Fig. 15 et 16, Tab. 8). De cette manière, nous avons confirmé que pour qu'il y ait une forte activité luciférase, il fallait que la luciférase soit séparée de la protéase. Ainsi, comme Denis Rasschaert l'avait observé dans diverses expériences, nous montrons, une fois encore, avec cette nouvelle construction, que la fusion d'une protéine à l'extrémité N-terminale de la luciférase entraîne la perte de l'activité enzymatique de cette dernière. Cette propriété, que nous avons exploitée dans nos tests, pourrait être liée à un changement de la conformation de l'enzyme au sein de la protéine de fusion. En effet, il a été démontré que de légères modifications (courte délétion, mutations ponctuelles et mutations aléatoires) dans l'extrémité N-terminale de la luciférase entraînaient une perte de l'activité de la luciférase directement liée aux changements que ces modifications induisaient dans la structure tertiaire de cette enzyme (Sung and Kang 1998).

Cette technique, qui, lors des essais préliminaires, avait seulement permis de révéler le clivage ou l'absence de clivage au niveau du site EG10, a montré des potentialités supérieures lors de l'analyse du clivage sur 10 sites EG répartis sur la séquence de la polyprotéine. En effet, la compilation des résultats obtenus lors de cette analyse montre, non seulement, que le pourcentage d'activité reflète la capacité de clivage de la protéase sur le site étudié mais aussi que ce pourcentage est proportionnel à l'intensité de la bande correspondant à la luciférase sur gel (Fig. 18 et Tab. 9) et, par conséquent, reflète exactement l'efficacité de clivage en *cis* de la protéase sur chaque site étudié.

Par ailleurs, il est important de noter que le niveau de RLU (unité de mesure de l'activité luciférase) était élevé et variait peu au sein des 2 systèmes (LRL ou vvT7/RK13). En effet, le nombre de RLU se situait entre 500 000 à 1000 000 dans le système LRL et entre 2000 000 à 5000 000 en système vvT7/RK13 pour les sites clivés, ce qui nous a permis de réaliser de calculs de pourcentage d'activités luciférase significatifs. De plus, il est important de souligner la bonne reproductibilité des mesures d'activité réalisées d'un essai à l'autre et, surtout, la parfaite corrélation des résultats obtenus dans les 2 systèmes (vvT7/RK13 et LRL). Cependant, chacun des 2 systèmes présente des avantages et des inconvénients. Le système LRL est un système souple, rapide et facilement utilisable en marquage radioactif. Néanmoins, il présente essentiellement 2 inconvénients caractéristiques des systèmes acellulaires. En effet, lors des expériences de cotraductions, la seconde construction entre en compétition avec la construction d'intérêt. Ainsi, bien que dans chaque expérience un standard interne ait été défini pour permettre la comparaison de l'efficacité de clivage entre 2 sites, il a été difficile de comparer 2 expériences qui ne mettaient pas en jeu les mêmes constructions. Le second inconvénient, qui est l'inconvénient majeur de ce système, est de permettre la traduction au niveau des AUG internes entraînant une augmentation du bruit de fond que nous avons estimé à 20%. Ainsi, l'utilisation d'un système cellulaire tel que le système vvT7/RK13 a permis de se rapprocher des conditions naturelles requises pour le processus de maturation de la polyprotéine et, surtout, de s'affranchir du bruit de fond généré par les initiations de traduction aux AUG internes. Cela dit, il s'agit d'un système qui requiert l'intervention du virus de la vaccine T7. Il faut toujours avoir à l'esprit que la présence de ce second virus pourrait causer un biais dans les processus de clivage en apportant, par exemple, un cofacteur exogène. Cependant, cela ne semble pas être le cas dans notre étude. En effet, l'obtention de résultats comparables en systèmes LRL et vvT7/RK13 permet d'exclure l'intervention d'un composant quelconque de la vaccine dans les différents essais réalisés au cours de ce travail. Pour s'acquitter des artefacts possibles liés à la présence du second virus, 2 lignées cellulaires stables comportant, intégré à leur génome, le gène de la polymérase T7 sous un promoteur inductible par la tétracycline (système Tet on) sont en cours de réalisation au laboratoire à partir des lignées cellulaires RK13 et LMH. Les lignées, une fois établies, faciliteraient les études ultérieures en s'affranchissant du virus de la vaccine T7.

L'intégration des données fournies lors de l'expression des 4 constructions pBPLEG10, pBPL10, pBPLEG10 κ o et pBPL11 a surtout conduit à démontrer que le processus de clivage nécessitait le concours de la protéase fonctionnelle et du site EG10. Cette observation, sur

laquelle était fondé en grande partie le travail de thèse, a, de plus, été confortée par la complémentation de la protéase mutée (pBPLEG10_{ko}) par la protéase 3CD (Fig. 17). Accessoirement, par ce test de complémentation, nous avons confirmé que le site nucléophile représenté par la cystéine 1212 est essentiel à l'activité de la protéase 3C-like (Boniotti *et al.*, 1994). La simplicité de mise en œuvre de cette technique fiable et reproductible, constitue un avantage important par rapport aux approches décrites précédemment. En effet, elle permet de faire une étude comparative plus exhaustive de l'efficacité de coupure à partir de différentes constructions lors d'un même essai. Ainsi, cette technique originale nous a fourni le moyen d'étudier le processus de clivage au niveau de tous les sites EG localisés le long de la polyprotéine : EG1 (54-55), EG2 (143-144), EG3 (339-340), EG4 (718-719), EG5 (776-777), EG6 (823-824), EG7 (1108-1109), EG8 (1168-1169), EG9 (1435-1436) et EG10 (1767-1768). L'analyse comparée de l'efficacité de clivage de la protéase sur ces différents sites a permis de les rassembler en 3 groupes (Fig. 20).

Le premier groupe est constitué de sites parfaitement clivés. Il comprend les sites EG4, EG7 et EG10 précédemment décrits dans la littérature mais surtout un nouveau site de clivage que cette étude a mis en évidence, le site EG2. Bien que l'existence d'un site de maturation situé en N-terminal de la polyprotéine ait été détecté par Wirblich *et al.* (1996) et König *et al.* (1998), le site de clivage impliqué n'avait pas été identifié jusqu'alors. Par ailleurs, comme nous l'avons déjà souligné, l'utilisation d'une approche systématique des sites potentiels de clivage nous a permis de comparer et de hiérarchiser l'efficacité de clivage au niveau des différents sites. Ainsi, l'efficacité de clivage au niveau des sites EG2, EG4, EG7 et EG10 s'est toujours révélée largement supérieure à l'efficacité de clivage au niveau des autres sites. Cependant, la hiérarchie établie suivant le taux du clivage pour chacun des 4 sites appartenant à ce groupe peut être différente selon le type d'activité testé. En effet, l'étude de l'activité protéolytique exprimée en *cis* par la protéase 3CL a montré que la coupure au niveau du site EG4 était la plus efficace et que les sites EG2 et EG7 étaient clivés avec une efficacité équivalente et supérieure à celle observée au niveau du site EG10 (EG4>EG2=EG7>EG10) (Fig. 20B). Alors que le clivage par l'activité *trans* de la protéase sur ces mêmes sites montre une meilleure efficacité au niveau du site EG2 qu'au niveau des 3 autres sites (EG2>EG4=EG7=EG10) (Fig. 28).

Le deuxième groupe est constitué des sites clivés faiblement. Il s'agit des sites EG3 et EG5. La sensibilité de notre technique est telle que nous avons pu détecter une activité protéolytique sur les sites EG3 et EG5 alors que le clivage au niveau de ces 2 sites n'avait pu être mis en évidence lors de l'étude du clivage en *trans* des polypeptides P22C et 2C3AB (Fig. 27C et D). En outre, des tests préliminaires sembleraient montrer que l'apport en *trans* de différentes protéines virales pourrait avoir une influence sur le clivage au niveau des sites EG3 et EG5. En effet, en système LRL, le clivage du site EG5 au sein de la protéine de fusion montrerait une légère augmentation par action en *trans* des protéases 3CY et 3CD (Fig. 28). De même, en système vvT7/RK13, le clivage du site EG3 serait légèrement stimulé par la présence de la polyprotéine alors que le clivage du site EG5 serait inhibé (Fig. 34).

Le troisième groupe est constitué de sites qui ne sont pas clivés. Il s'agit des sites EG1, EG6, EG8 et EG9. Notons que, dans notre système, une telle variation de clivage entre les différents

dipeptides EG ne tient qu'à la nature des acides aminés constituant le site octapeptidique centré sur le dipeptide EG.

Nous avons aussi testé le site ET identifié comme étant clivé faiblement par la protéase 3C-like dans un système bactérien (Wirblich *et al.*, 1995) bien qu'il n'ait pu être confirmé dans le système eucaryote LRL (Wirblich *et al.*, 1996). Dans notre étude que ce soit en système LRL ou en système vvT7/RK13, il n'a pas pu être démontré un clivage en *cis* au niveau de ce site. Cependant, une étude préliminaire, qui reste donc à confirmer, sur l'intervention de cofacteurs d'origine virale en système vvT7/RK13 a permis de constater une légère activité protéolytique au niveau du site ET en présence de la polyprotéine (Fig. 34). Cette activité correspondrait à un clivage de 18% (au lieu de 4,8%) par rapport au clivage du site EG10 dans les mêmes conditions. Il est important de noter que cette activité n'a pu être observée en présence des produits de maturation p16, p65, p41 ou p72. Ce qui semblerait indiquer que, si la stimulation du clivage ET s'avère réelle, elle serait nécessairement dépendante soit d'un produit de maturation différent des intermédiaires primaires soit de l'action conjuguée d'au moins 2 de ces produits de maturation primaires.

Enfin lors de cette approche très dirigiste, nous avons également testé le clivage au niveau d'un dipeptide QG installé dans un environnement favorable (environnement du site EG10) pour 2 raisons précises. D'une part, la protéase 3C du poliovirus avait pour site de clivage préférentiel le dipeptide QG (Palmenberg 1990) et d'autre part, il avait été démontré dans le système LRL que la libération de l'hélicase se faisait par clivage au niveau de 2 dipeptides QG chez le Southampton virus (Liu *et al.*, 1996). Cependant, après avoir mis en évidence l'efficacité du clivage au niveau du dipeptide QG installé dans l'environnement du site EG10, nous avons montré que 2 des 3 sites QG recensés sur la polyprotéine du RHDV, soient les sites QG1 (940-941) et QG2 (993-994) (Fig. 20B), ne correspondent pas à des sites de maturation. Le troisième site, QG3 (1775-1776), n'a pas été inclus dans les essais bien que Sylvie Laurent ait montré qu'une protéine commençant au niveau de la glycine 1776 était capable de s'auto-assembler en pseudoparticules (Laurent *et al.*, 1994) ; ce site est situé quelques acides aminés après le début de la protéine de capsid. Par ailleurs, il a été démontré que la protéine de capsid commençait soit par la méthionine si elle était traduite à partir de l'ARN subgénomique, soit par la glycine 1768 du site EG10 si elle provenait du clivage de la polyprotéine (Boniotto *et al.*, 1994, Parra *et al.*, 1993, Sibia *et al.*, 1995, Wirblich *et al.*, 1995).

Les différentes études existant sur les mécanismes de maturation de la polyprotéine des calicivirus ont mis en évidence un nombre de possibilités restreint pour les acides aminés en position P1 et P1' : EG, EA, QG, ES et ET (Liu *et al.*, 1996, Liu *et al.*, 1999, Seah *et al.*, 1999, Sosnovtsev *et al.*, 1998, Sosnovtseva *et al.*, 1999). Plus particulièrement, la mutagenèse dirigée sur les positions P1 et P1' du site EG7 de la polyprotéine du RHDV a permis de montrer que seuls les acides aminés acide glutamique (E), glutamine (Q) et acide aspartique (D) étaient tolérés en position P1 et que les acides aminés glycine (G), sérine (S) et alanine (A) permettaient un meilleur clivage lorsqu'ils occupaient la position P1' (Wirblich *et al.*, 1995). Afin de poursuivre la recherche de nouveaux sites de clivage potentiel nous avons décidé une approche moins dirigiste, par mutagenèse aléatoire du dipeptide EG2 en conservant son

environnement (Tab. 12), sachant qu'il était statistiquement inconcevable d'être exhaustif en obtenant toutes les combinaisons possibles d'acides aminés avec cette technique. De plus, en s'apercevant que, lors de la synthèse des oligonucléotides, il y avait un biais limitant la gamme des dipeptides à tester par incorporation préférentielle d'une ou 2 bases sur les 4 possibles au niveau de chacun des 6 sites mutés, nous avons décidé de restreindre l'étude aux 50 premiers mutants. Ainsi, nous avons mis en évidence 6 sites, QS, NV, QA, SA, RP, GS et GV, qui dans nos constructions pouvaient induire une activité luciférase supérieure à 50% lors d'expression en système LRL. Lors de nos essais de mutagenèse, nous n'avons pu obtenir de dipeptides EX ou DX. Cependant, nous avons obtenu un large panel de dipeptide QX : QA, QS, QF, QI, QP, QR et QL. Parmi ces différents dipeptides, seuls les dipeptides QA et QS induisent un clivage significatif, ce qui confirme la nécessité d'un acide aminé avec un faible encombrement stérique en position P1'. Cependant, le recensement des dipeptides sur la séquence de la polyprotéine (Tab. 15) montre qu'il n'existe aucun dipeptide QS, ce dernier ne peut donc être un point de maturation. Par contre, on trouve des dipeptides QA en 7 points de la polyprotéine. En fait, l'intégration des différentes informations, apportées par l'utilisation d'une technique mi-dirigiste, mi-aléatoire en ne mutant qu'une position à la fois, aurait peut être permis d'apporter des informations plus riches.

Tableau 15 : Recensement sur la polyprotéine du RHDV des différents dipeptides étudiés dans le cadre de la mutagenèse dirigée aléatoire sur le site EG2

Dipeptides	Effectifs
QS	0
NV	5
QA	7
SA	8
RP	10
GS	13
GV	21

L'ensemble des observations précédentes conforte le rôle essentiel de l'environnement proche du site de coupure. En effet, nous avons montré précédemment qu'un même dipeptide EG correspondait ou ne correspondait pas à un site de clivage selon le contexte dans lequel il était situé. De plus, lors de ces essais, nous montrons que des dipeptides non spécifiques (NV, SA, RP, GS et GV), selon les critères définis par Wirblich *et al.* (1995), placés dans un environnement très favorable pouvaient être légèrement clivés par la protéase 3C-like.

Ainsi, ces dernières observations montrent que bien que le clivage soit fortement conditionné par la nature des acides aminés situés en positions P1 et P1', l'environnement du dipeptide substrat présente un rôle essentiel dans le processus de clivage. En effet, on observe des différences d'efficacité de clivage au niveau des différents sites EG alors que seuls les 6 acides aminés environnant le dipeptide EG diffèrent. Cependant, l'alignement des séquences peptidiques des sites EG clivés ou non clivés ne permet pas de faire ressortir une séquence consensus (Tab. 16). Par ailleurs, l'analyse comparative de la séquence peptidique du site non clivé EG9 avec celle du site clivé EG10, montre que les environnements de ces 2 sites sont très voisins. Ils présentent en fait 3 différences au niveau des positions P4, P2 et P3'. La

position P4 du site EG10 présente une asparagine alors que celle du site EG9 présente une lysine, la position P2 présente une méthionine au lieu d'une lysine et la position P3' une alanine au lieu d'une lysine. Au cours du DEA de Carine Pautigny, il a été montré au laboratoire que la nature de l'acide aminé en position P3' ne semble pas influencer le clivage au niveau des sites. En effet, l'échange réciproque des acides aminés P3' des sites EG10 et EG9, n'entraînait pas de modification dans l'efficacité de clivage à ces sites. Il apparaissait même un gain d'efficacité de clivage au niveau du site EG10 muté 1 (NV**MEG**KKR) par rapport à celle du site EG10 d'origine (NV**MEG**KAR). L'analyse de la séquence peptidique du côté N-terminal du site EG9 fait apparaître un fort caractère basique. Bien que l'on ne puisse exclure que cette forte basicité puisse expliquer l'absence de coupure au niveau du site EG9, nous privilégions plutôt l'hypothèse d'un contexte favorisant le clivage au niveau du site EG10. Ainsi, l'analyse du tableau 2 met en relief la présence d'acides aminés hydrophobes (méthionine, phénylalanine et tyrosine) en position P2 des 4 sites clivés. De plus, Wirblich *et al.* (1995) ont montré que le remplacement de la tyrosine par une phénylalanine, une leucine ou une méthionine à la position P2 du site EG7 par mutagenèse dirigée ne perturbait aucunement l'efficacité de clivage au niveau de ce site. Par ailleurs, C. Pautigny (1996) a établi que la mutation de la méthionine en une sérine sur le site EG10 (muté 2) entraîne une perte totale de l'efficacité de clivage. Ces différentes observations tendraient à montrer que la nature de l'acide aminé en position P2 influencerait sur le processus de clivage. Cependant, l'analyse attentive du tableau 2, nous conduit à relativiser cette dernière observation. En effet, le site QG2 présente une phénylalanine en position P2 sans pour autant être clivé alors qu'un dipeptide QG installé dans l'environnement du site EG10 permet un léger clivage par la protéase 3C-like. Ces différentes observations nous conduisent à une notion plus globale de la conjonction d'effets positifs ou négatifs liés aux interactions qui s'établissent entre le dipeptide et son environnement. En d'autres termes, ce sont les interactions réciproques qui existent entre le dipeptide et les acides aminés présents dans son voisinage direct qui influencent l'efficacité du clivage.

Tableau 16 : Séquences peptidiques des différents sites étudiés lors de ce travail

Position	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
EG2	P	V	F	E	G	E	V	D
EG4	A	S	F	E	G	A	N	R
EG7	N	D	Y	E	G	L	P	G
EG10	N	V	M	E	G	K	A	R
EG10 muté 1	N	V	M	E	G	K	K	R
EG1	Y	G	K	E	G	P	L	E
EG6	N	G	V	E	G	V	T	V
EG8	Q	I	A	E	G	T	P	V
EG9	K	V	K	E	G	K	K	R
EG10 muté 2	N	V	S	E	G	K	A	R
ET	G	V	Y	E	T	S	N	F
QG1	R	G	D	Q	G	V	D	V
QG2	K	A	F	Q	G	V	K	G
EG3	L	I	V	E	G	V	K	S
EG5	P	K	I	E	G	C	V	E

L'influence des acides aminés situés dans le voisinage direct du dipeptide substrat de la protéase 3C a également été remarquée chez les picornavirus. Bien que n'ayant pu

caractériser une séquence consensus déterminant un environnement favorable, il a été observé qu'un petit nombre d'acides aminés se retrouvait préférentiellement en position P4 de certains sites de clivage de la polyprotéine du poliovirus. Il s'agissait des acides aminés valine, thréonine, proline mais, surtout, de l'acide aminé alanine (Blair and Semler 1991). De plus, il a été montré, chez le poliovirus, que la maturation du précurseur comportant toutes les protéines de capsidie nécessite des interactions complexes entre la molécule précurseur et la protéase. En effet, la maturation de ce précurseur requiert une séquence peptidique primaire définie mais aussi des structures secondaires et une structure tertiaire bien spécifique. Ainsi, la localisation précise des peptides QG cibles dans le repliement tertiaire de cette molécule précurseur semble nécessaire et, par ailleurs, sa maturation est inhibée par l'altération des feuillettes β au sein du précurseur (Ypma-Wong *et al.*, 1988). Dans cet esprit, les essais de clivage *in trans* de la protéase 3C-like sur différents polypeptides recouvrant la polyprotéine du RHDV (Fig. 27) ont permis d'appréhender l'effet d'un environnement plus large sur l'efficacité de clivage. Ces essais ont abouti à la confirmation du clivage au niveau des 4 sites majeurs (EG2, EG4, EG7 et EG10) mais n'ont pas conduit à la mise en évidence de nouveaux sites de clivage.

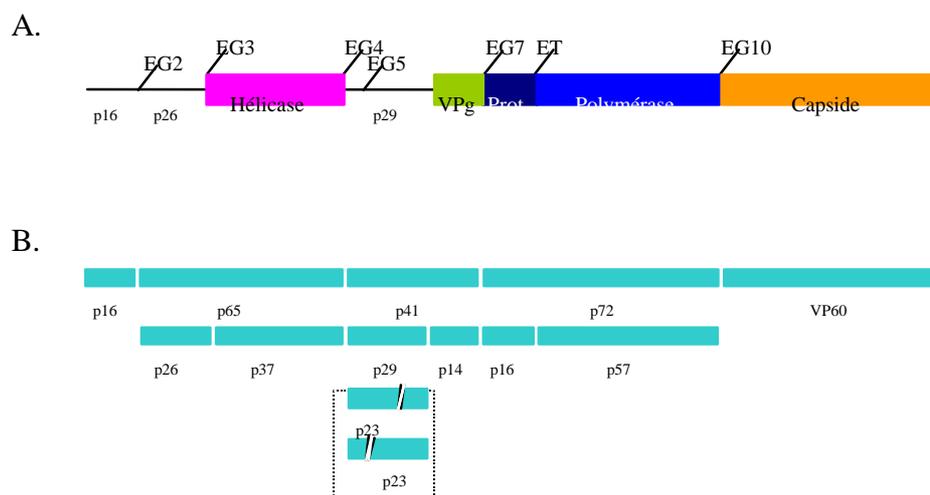


Figure 37 : Représentation schématique des événements de maturation de la polyprotéine décrits par König *et al.* (1998). A. Polyprotéine du RHDV. Les protéines dont la fonction est identifiée sont représentées par des cadres. Les sites pouvant expliquer les points de maturation sont indiqués. B. Les rectangles verts représentent les polypeptides générés par maturation de la polyprotéine. L'encadré en pointillé précise le clivage informel du polypeptide p29.

A partir de l'analyse de l'expression des protéines virales lors d'infection par RHDV des cellules primaires de foie de lapin, König *et al.* (1998) ont défini un modèle de maturation de la polyprotéine du RHDV (Fig. 37). Celle-ci semble requérir au moins 2 étapes successives lors desquelles la polyprotéine subit 8 points de clivage. Les 4 sites, EG2, EG4, EG7 et EG10, mis en évidence par notre technique permettent de décrire parfaitement la première étape de maturation. Cette première étape conduit à la libération de 5 polypeptides : p16 qui est une protéine virale mature, p65, est un intermédiaire contenant la p26 et l'hélicase, p41, est un intermédiaire de maturation contenant la p29 et la VPg, p72, l'intermédiaire de maturation 3CD contenant la protéase et la polymérase et, VP60, la protéine majeure de capsidie. Le site EG2

permettrait le clivage par la protéase 3C-like aux extrémités C-terminale de p16 et N-terminale de p65, le site EG4, le clivage aux extrémités C-terminale de p65 et N-terminale de p41, le site EG7, le clivage aux extrémités C-terminale de p41 et N-terminale de p72 et le site EG10, le clivage aux extrémités C-terminale de p72 et N-terminale de VP60.

La deuxième étape de maturation peut être reliée aux sites plus faiblement clivés dans notre étude tels que les sites EG3 et EG5. Le site EG3 permettrait de décrire le clivage à l'extrémité N-terminale de l'hélicase et donc d'obtenir la libération complète de l'hélicase. Le site EG5 permettrait de trancher entre les 2 hypothèses de König *et al.* (1998) (Fig. 37) en localisant le clivage du polypeptide p29 du côté N-terminal. Notons qu'un clivage au niveau du site EG5 ne pourrait prendre effet que lors d'une troisième étape de maturation de la polyprotéine.

Notre étude n'apporte pas de réponse quant au clivage du précurseur p72. Le site ET constitue un candidat attrayant pour expliquer la maturation de la protéase et de la polymérase : il est placé dans un environnement favorable (non basique du côté N-terminal et tyrosine à la position P2) et il a été décrit comme faiblement clivé dans un système bactérien (Wirblich *et al.*, 1995). Cependant, le fait que le site ET ne soit pas clivé en système LRL (Fig. 20) (Wirblich *et al.*, 1996) nous conduit à relativiser les résultats obtenus dans un système bactérien. En effet, l'identification du clivage à l'extrémité C-terminale de la protéase 3C-like du FCV par utilisation d'un système bactérien (Sosnovtseva *et al.*, 1999) avait conduit à l'identification de 2 sites faiblement clivés, un site ET et un site EG. Or, ce site ET entraînerait, chez FCV, la libération d'une protéase 3C-like de 30 kDa, taille largement supérieure aux tailles établies pour la protéase 3C-like du RHDV (16 kDa), du Southampton virus (20 kDa) et du Camberwell virus (20 kDa) (König *et al.*, 1998, Liu *et al.*, 1999, Seah *et al.*, 1999) et le site EG entraînerait la libération d'une polymérase non fonctionnelle. Ces résultats ont tendance à démontrer que le système bactérien induit des conditions autorisant des clivages non spécifiques par la protéase virale. En fait, seul le séquençage N-terminal du polypeptide p57 observée dans l'étude de König *et al.* (1998) permettrait d'établir formellement la nature du site qui conduit au clivage entre la protéase 3C-like et la polymérase du RHDV.

De même, beaucoup d'hypothèses peuvent être émises quant au clivage N-terminal de la VPg. Aucun dipeptide EG n'est présent dans la région N-terminale de la VPg et les sites QG1 (940-942) et QG2 (993-994) testés dans notre étude, quelles que soient les conditions que nous avons utilisées, n'ont pas présenté la moindre possibilité d'être clivés. Là encore, il semble que seul le séquençage N-terminal de la protéine p14 puisse renseigner sur ce site de coupure.

Cependant, pour envisager le séquençage, il paraît nécessaire d'améliorer le système de culture du RHDV ou de mettre au point des cellules exprimant la polymérase T7. En effet, la méthode utilisée par König *et al.* (1998) pour préciser les étapes de la maturation, bien qu'apportant beaucoup d'informations sur le processus de maturation de la polyprotéine du RHDV, présente comme défaut majeur l'absence de production de virus infectieux. Ainsi, l'infection des hépatocytes maintenus en culture sans division durant 4 semaines se limite aux hépatocytes infectés lors de l'infection primaire.

L'analyse du profil de maturation de la polyprotéine du RHDV a permis de montrer que dans notre modèle le processus de maturation était un événement rapide et post-traductionnel (Fig.

30). En effet, lors de l'étude cinétique de ce processus, nous avons observé 2 bandes, une bande nette estimée à 250 kDa et une bande diffuse à 150 kDa, qui disparaissaient après 3h d'expression. La présence de la bande de 250 kDa correspondant à la polyprotéine indique que dans notre modèle le processus de maturation prend effet après une production totale de la polyprotéine. Ce qui est différent du poliovirus pour lequel les premières étapes de la maturation sont des événements cotraductionnels (Ryan and Flint 1997). Les tests d'immunoprécipitation (Fig. 31) par l'Ac monoclonal anti-VP60 réalisés après 3h d'expression montrent que la protéine de capsid n'est présente que sous forme mature (62 kDa). Ce résultat signifie que le site EG10 est très efficacement clivé. Par ailleurs, les tests d'immunoprécipitation réalisés avec le sérum polyclonal anti-3D ont permis de constater 3 intermédiaires de maturation stables de 110 kDa, 88 kDa et 72 kDa. Ces 3 intermédiaires de maturation, n'étant pas révélés par l'Ac monoclonal anti-VP60, se terminent nécessairement au niveau du site EG10. Nous pouvons en déduire (Fig. 38) que le produit de maturation de 110 kDa correspond à un intermédiaire de maturation débutant au niveau du site EG4 (116 kDa), que le produit de maturation de 88 kDa correspond à un intermédiaire débutant au point de clivage situé à l'extrémité N-terminale de la VPg (87 kDa) et le produit de maturation de 72 kDa correspond à l'intermédiaire de maturation p72 décrit par König *et al.* (1998). Il est important de noter que, dans notre modèle, on ne décèle aucun produit de maturation de 58 kDa correspondant à la polymérase mature.

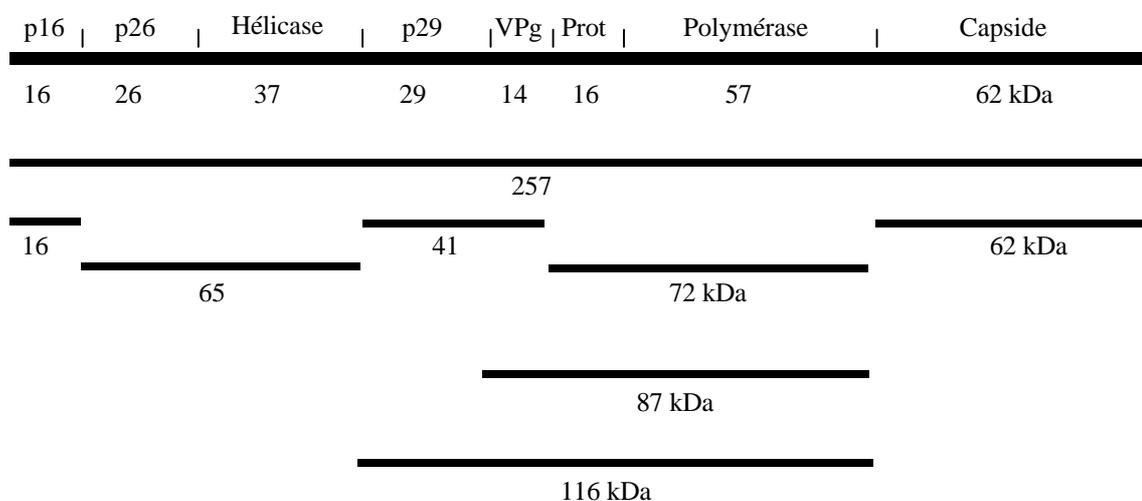


Figure 38 : Profil de maturation de la polyprotéine du RHDV. Les différentes protéines définies par König *et al.* (1998) sont présentées au-dessus de la polyprotéine et les intermédiaires de maturation au-dessous de la polyprotéine.

Ainsi, que ce soit dans le modèle de König *et al.* (1998) ou dans le nôtre, l'intermédiaire p72 est décrit comme une molécule stable. De même, un précurseur p78 similaire à l'intermédiaire p72 du RHDV a été observé dans les cellules infectées par le FCV sans que ne soient détectées la protéase ou la polymérase sous leur forme mature (Sosnovtseva *et al.*, 1999). Par ailleurs, il a été démontré que l'autoclivage de la molécule 3CD du poliovirus était très faible et qu'il était augmenté par une activité protéolytique exprimée en *trans* par la protéase 3CD sur elle-même,

augmentation directement liée au nombre de molécules 3CD générées (Lawson and Semler 1990, Parsley *et al.*, 1999). Dans notre étude, l'analyse du clivage en *trans* de la protéine de fusion (protéase-ET-luciférase) par la protéase sous sa forme 3CD n'a pas mis en évidence une telle activité autocatalytique (Fig. 28).

Chez le poliovirus, il a été démontré que la protéase présentait une différence de spécificité de clivage suivant sa forme 3C ou 3CD. Plus précisément, la forme 3CD de la protéase du poliovirus permet une maturation efficace et complète du précurseur P1 comportant les protéines de capsid, ce qui n'est pas le cas de la protéase sous sa forme 3C (Jore *et al.*, 1988, Parsley *et al.*, 1999, Ypma-Wong *et al.*, 1988). De plus, 3CD permet une maturation plus efficace et plus rapide du précurseur P3 que 3C et toutes 2 montrent les mêmes qualités de clivage lors de la maturation du précurseur P2 (Parsley *et al.*, 1999). En fait, il semblerait que seule la forme 3CD de la protéase du poliovirus ait toutes les qualités requises pour la maturation complète de la polyprotéine. Ainsi, lors du travail de thèse, il nous a été possible d'une part de définir la capacité de clivage de la protéase courte située entre les acides aminés 1109 et 1251 (3CY) et d'autre part de comparer l'efficacité de clivage entre la protéase courte (3CY) et le précurseur p72 (3CD). Nous avons donc mené une analyse de la capacité de clivage en *trans* de différentes formes de la protéase (3CX, 3CY, 3CZ, 3CL et 3CD) sur le site EG2 (Fig. 23). Ces différentes formes de la protéase 3C-like correspondent à l'intermédiaire de maturation p72 (3CD) plus ou moins délétée en son extrémité C-terminale (Fig. 22). Ainsi, la protéase 3CX correspond à la séquence polypeptidique allant de l'acide aminé 1109 à l'acide aminé 1217 de la polyprotéine, la protéase 3CY de l'acide aminé 1109 à 1251, la protéase 3CZ de l'acide aminé 1109 à l'acide aminé 1356, la protéase 3CL de l'acide aminé 1109 à l'acide aminé 1435 et la protéase 3CD de l'acide aminé 1109 à 1767. Seule la protéase 3CX ne possède plus d'activité protéolytique décelable en système LRL, bien qu'elle présente encore les acides aminés définissant la triade catalytique caractéristique des chymotrypsine-like cystéine protéases : His-1135, D-1152 et C-1212. Ce résultat obtenu avec la protéase 3CX (1109-1217) est à rapprocher des résultats décrits par Boniotti *et al.* (1994) qui avaient suggéré une participation essentielle de l'His-1227 dans le mécanisme catalytique. En tout premier lieu parce que la mutation en asparagine ou leucine de cette histidine entraîne une perte de l'activité protéolytique mais aussi parce que cette histidine est conservée dans la séquence des protéases virales ayant pour cible un dipeptide EG. Ainsi, les auteurs ont émis l'hypothèse que cette histidine tout en ne faisant pas partie du site actif pourrait intervenir dans la fixation du substrat. Toutes les autres protéases, 3CY, 3CZ, 3CL et 3CD, clivent efficacement le site EG2 en *trans*. Cependant, il faut noter que l'on peut définir un gradient d'efficacité directement lié à la longueur du segment de la polymérase en fusion avec la protéase, avec une efficacité maximale pour le précurseur p72 (3CD) (Fig. 23)

L'examen dans le détail de l'action en *cis* des protéases 3CY et 3CL sur les différents sites EG rencontrés sur la polyprotéine met en évidence des différences de clivage entre ces 2 protéases (Fig. 39). Plus précisément, l'efficacité de clivage de la protéase 3CY par rapport à celle de la protéase 3CL est réduite de moitié au niveau des sites EG4 et EG10 et de 3/4 au niveau du site EG7. Par ailleurs, il est important de noter l'apparition d'un faible clivage par la

protéase 3CY au niveau des sites non clivés par la protéase 3CL tels que les sites EG1, EG6, EG8, EG9, QG1 et QG2. L'ensemble de ces observations montre que non seulement la protéase 3CY présente une efficacité de clivage moindre sur les sites EG4, EG7 et EG10 mais qu'en plus elle semble perdre une partie de sa spécificité de clivage.

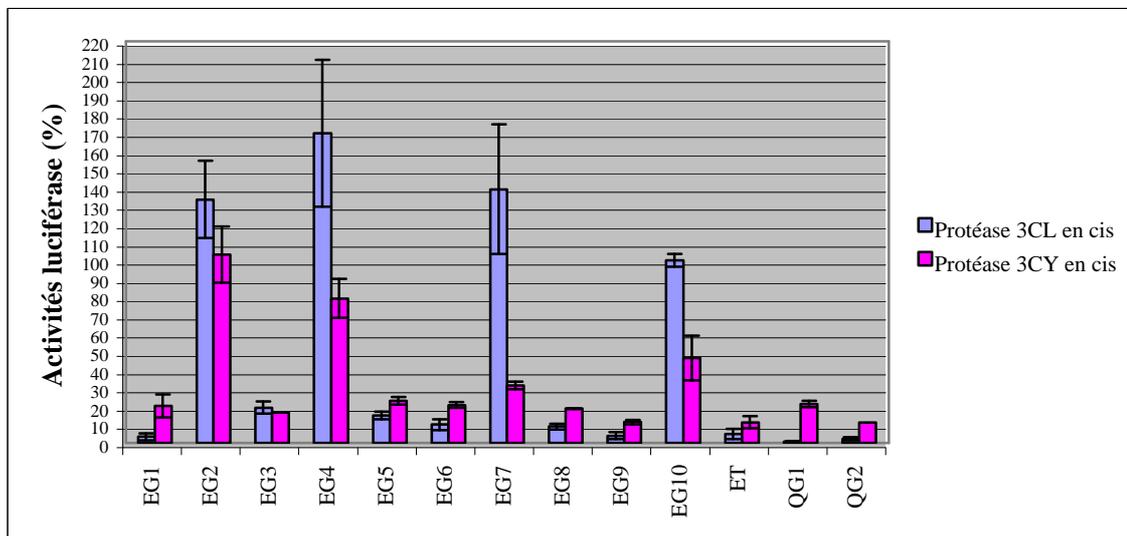


Figure 39 : Histogramme récapitulatif comparant les activités luciférase après expression en système vvT7/RK13 des constructions portant le gène 3CY avec les activités luciférase des constructions portant le gène 3CL. Les activités luciférase sont rapportées en pourcentage de celle de pBPLEG10 dans chaque essai.

Ainsi, de proche en proche, partant du principe que la protéase 3CL présente une efficacité de clivage en *cis* supérieure à celle de la protéase 3CY, nous pouvons supposer que la protéase 3CD présenterait aussi une activité de clivage en *cis* supérieure à celle de 3CY. D'ailleurs, lors de l'analyse du profil de maturation en système LRL (Fig. 31), nous n'avons d'une part décelé que la protéase 3CD et nous avons d'autre part observé un clivage rapide des sites EG4, EG7 et EG10. Or, le clivage au niveau des sites EG7 et EG10 ne peut se réaliser que par une manifestation en *cis* de l'activité protéolytique de la protéase 3CD. Ainsi, dans notre modèle, nous montrons que la protéase du RHDV est plus efficace sous sa forme 3CD que sous sa forme 3CY et que la forme 3CY ne semble pas posséder une spécificité de clivage particulière lors de la maturation de la polyprotéine du RHDV. On pourrait supposer que, comme pour le poliovirus, le précurseur p72 suffirait à la maturation de la polyprotéine du RHDV et que le clivage de cet intermédiaire serait nécessaire à d'autres fonctions durant le cycle viral. Notamment, chez le poliovirus, le clivage du précurseur 3CD a été décrit comme faible et tardif dans le cycle mais nécessaire pour que la polymérase 3D soit fonctionnelle (Harris *et al.*, 1992, Lawson and Semler 1990, Molla *et al.*, 1994). Par ailleurs, dans différentes études, il est fait état de l'intervention de la forme 3C de la protéase pour le clivage de diverses protéines cellulaires telles que le facteur d'initiation de la traduction eIF4A, l'activateur de transcription Oct-1 et une protéine du cytosquelette (Belsham *et al.*, 2000, Joachims *et al.*, 1995, Yalamanchili *et al.*, 1997). Cette activité protéolytique manifestée par la forme 3C de la protéase des picornavirus semble intervenir dans les étapes tardives de la production des

virions et provoquer la mort par apoptose des cellules hôtes (Barco *et al.*, 2000). Ainsi, bien que cela reste à démontrer, il se pourrait que, comme pour le poliovirus, le clivage du précurseur p72 de RHDV interviennent tardivement dans le cycle viral et soit nécessaire pour que la polymérase 3D puisse présenter une activité.

De façon évidente, la protéase du poliovirus a un rôle majeur dans la régulation du cycle viral. Ce rôle prendrait effet en modulant le taux de clivage sur certains points de maturation pour permettre la production d'intermédiaires de maturation stables. En effet, il a été remarqué que chez le poliovirus les intermédiaires de maturation possèdent une fonction indispensable au bon déroulement du cycle viral. Pour exemple, l'intermédiaire 2BC facilite la formation des virions dans les cellules infectées en augmentant le niveau calcique intracellulaire (Aldabe *et al.*, 1997) et les intermédiaires 3AB et 3CD forment un complexe ribonucléoprotéique avec l'extrémité 5' de l'ARN génomique entraînant l'arrêt de la traduction et favorisant la synthèse de nouveaux exemplaires de l'ARN génomique (Gamarnik and Andino 1998, Harris *et al.*, 1994). Ainsi, dans notre modèle, la protéase du RHDV pourrait aussi présenter une fonction de régulation du cycle viral de par son efficacité de coupure différentielle sur certains sites. En effet, nous avons observé la présence d'intermédiaires de maturation stables p116, p87 et p72 (Fig. 37 et 31) qui pourraient jouer un rôle dans le cycle viral. A titre d'exemples, le faible clivage observé au niveau du site EG3 permet l'accumulation de l'intermédiaire p65 et le clivage du site EG2, la libération rapide et efficace de la protéine p16, ce qui pourrait être relié à un rôle de p16 et p65 lors d'événements précoces du cycle viral.

L'organisation des protéines non structurales au sein de la polyprotéine du RHDV montre une remarquable similarité avec celle des picornavirus. Cette analogie, bien qu'ayant permis d'identifier l'hélicase, la protéase 3C-like et l'ARN polymérase ARN dépendante au sein de la polyprotéine du RHDV, n'a pu permettre l'identification de la fonction des protéines p16, p26 et p29 (Meyers *et al.*, 1991). Notamment, le poliovirus présente une activité protéolytique supplémentaire exprimée par la protéase 2A (Ryan and Flint 1997). Cependant, aucune étude dans le monde des calicivirus n'a rapporté la possibilité d'une protéase en sus de la protéase 3C-like. D'ailleurs, Boniotti *et al.* (1994) avaient démontré que la partie N-terminale de l'acide aminé 9 à l'acide aminé 1032 de la polyprotéine du RHDV ne présentait pas d'activité autocatalytique. De même, dans le cas de notre étude, nous n'avons pu observer d'activité autocatalytique des protéines p16 et p29 au sein des polypeptides P1P2 et 2C3AB. Il a, donc, été suggéré que la protéase 3C-like soit la seule responsable de la maturation de la polyprotéine du RHDV (Wirblich *et al.*, 1996). Cependant, à ce jour, aucune étude n'a permis d'exclure l'intervention d'une protéase d'origine cellulaire.

Conclusion/Perspectives

Au début de ce travail, peu d'informations étaient disponibles sur les mécanismes de maturation de la polyprotéine du RHDV. Par ailleurs, le virus RHDV ne se multipliant pas en culture cellulaire les moyens d'investigation étaient limités.

L'utilisation du gène de la luciférase comme gène rapporteur nous a permis d'élaborer une technique originale permettant d'évaluer le taux de clivage sur différents sites par expression *in cis* de l'activité protéolytique de la protéase du RHDV. Cette technique a pu, non seulement, être utilisée en système d'expression TNT7/lysate de réticulocytes mais aussi en système vaccin T7/cellules de rein de lapin. En effet, à l'époque, la recherche des sites de clivage permettant de décrire le processus de maturation de la polyprotéine du RHDV se faisait classiquement en système bactérien ou TNT7/lysate de réticulocytes de lapin. Le système vaccin T7/cellules de reins de lapin a permis d'étudier les mécanismes de la maturation dans un système eucaryote cellulaire.

Cette technique originale s'est révélée souple, reproductible et simple d'utilisation. Elle a permis d'identifier un nouveau site parfaitement clivé, le site EG2 (143-144) et des sites faiblement clivés EG3 (339-340) et EG5 (776-777). Ces 3 sites de clivage s'intègrent parfaitement dans le modèle de maturation proposé par König *et al.* (1998).

Ce travail de thèse permet de présenter pour la première fois une analyse comparée de l'activité protéolytique de la protéase courte (1109-1251) telle qu'elle a été décrite par Wirblich *et al.* (1995) avec celle du précurseur p72 (3CD). La protéase courte est capable d'exercer une activité *trans* au niveau des sites EG2, EG4 et EG10 et d'une activité *cis* au niveau des sites EG2, EG4, EG7 et EG10. Cependant, il semblerait que ce soit la protéase p72 qui possède la meilleure efficacité de clivage et qui soit donc responsable de la maturation de la polyprotéine du RHDV.

Bien qu'ayant répondu à des questions essentielles, ce système semble trop limité pour bien décrire la maturation complète de la polyprotéine du RHDV. Il semble nécessaire de développer un système de culture cellulaire permettant la réplication du virus ou permettant l'expression de la construction de pUGG10 (cellules Tet on). Ces systèmes cellulaires pourraient non seulement aboutir à une production suffisante de protéines virales pour réaliser des expériences de séquençage N-terminal et d'identifier ou confirmer les sites de maturation mais en plus, elle permettrait l'étude des interactions moléculaires intervenant dans le cycle viral.

- Abu Elzein, E. M., al-Afaleq, A. I., 1999. Rabbit haemorrhagic disease in Saudi Arabia. *Vet Rec* 144, 480-481.
- Aldabe, R., Irurzun, A., Carrasco, L., 1997. Poliovirus protein 2BC increases cytosolic free calcium concentrations. *J Virol* 71, 6214-6217.
- Allaire, M., Chernaia, M. M., Malcolm, B. A., James, M. N., 1994. Picornaviral 3C cysteine proteinases have a fold similar to chymotrypsin-like serine proteinases. *Nature* 369, 72-76.
- Alonso, C., Oviedo, J. M., Martin-Alonso, J. M., Diaz, E., Boga, J. A., Parra, F., 1998. Programmed cell death in the pathogenesis of rabbit hemorrhagic disease. *Arch Virol* 143, 321-332.
- Arguello Villares, J. L., 1991. Viral haemorrhagic disease of rabbits: vaccination and immune response. *Rev Sci Tech* 10, 459-480.
- Asgari, S., Hardy, J. R., Sinclair, R. G., Cooke, B. D., 1998. Field evidence for mechanical transmission of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) by flies (Diptera:Calliphoridae) among wild rabbits in Australia. *Virus Res* 54, 123-132.
- Ball, J. M., Graham, D. Y., Opekun, A. R., Gilger, M. A., Guerrero, R. A., Estes, M. K., 1999. Recombinant Norwalk virus-like particles given orally to volunteers: phase I study [see comments]. *Gastroenterology* 117, 40-48.
- Barco, A., Feduchi, E., Carrasco, L., 2000. Poliovirus protease 3C(pro) kills cells by apoptosis. *Virology* 266, 352-360.
- Bartenschlager, R., Ahlborn-Laake, L., Mous, J., Jacobsen, H., 1994. Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. *J Virol* 68, 5045-5055.
- Bazan, J. F., Fletterick, R. J., 1988. Viral cysteine proteases are homologous to the trypsin-like family of serine proteases: structural and functional implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 7872-7876.
- Becker, A. B., Roth, R. A., 1992. An unusual active site identified in a family of zinc metalloendopeptidases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3835-3839.
- Belsham, G. J., McInerney, G. M., Ross-Smith, N., 2000. Foot-and-mouth disease virus 3C protease induces cleavage of translation initiation factors eIF4A and eIF4G within infected cells. *J Virol* 74, 272-280.
- Berke, T., Golding, B., Jiang, X., Cubitt, D. W., Wolfaardt, M., Smith, A. W., Matson, D. O., 1997. Phylogenetic analysis of the Caliciviruses. *J Med Virol* 52, 419-424.
- Bertagnoli, S., Gelfi, J., Le Gall, G., Boilletot, E., Vautherot, J. F., Rasschaert, D., Laurent, S., Petit, F., Boucraut-Baralon, C., Milon, A., 1996. Protection against myxomatosis and rabbit viral hemorrhagic disease with recombinant myxoma viruses expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. *J Virol* 70, 5061-5066.
- Blair, W. S., Li, X., Semler, B. L., 1993. A cellular cofactor facilitates efficient 3CD cleavage of the poliovirus P1 precursor. *J Virol* 67, 2336-2343.
- Blair, W. S., Semler, B. L., 1991. Role for the P4 amino acid residue in substrate utilization by the poliovirus 3CD proteinase. *J Virol* 65, 6111-6123.

- Boniotti, B., Wirblich, C., Sibilía, M., Meyers, G., Thiel, H. J., Rossi, C., 1994. Identification and characterization of a 3C-like protease from rabbit hemorrhagic disease virus, a calicivirus. *J Virol* 68, 6487-6495.
- Bousslama, A., De Mia, G. M., Hammami, S., Aouina, T., Soussi, H., Frescura, T., 1996. Identification of the virus of rabbit haemorrhagic disease in Tunisia. *Vet Rec* 138, 108-110.
- Bradley, D. W., 1990. Enterically-transmitted non-A, non-B hepatitis. *Br Med Bull* 46, 442-461.
- Burroughs, J. N., Brown, F., 1978. Presence of a covalently linked protein on calicivirus RNA. *J Gen Virol* 41, 443-446.
- Burroughs, J. N., Doel, T. R., Smale, C. J., Brown, F., 1978. A model for vesicular exanthema virus, the prototype of the calicivirus group. *J Gen Virol* 40, 161-174.
- Burroughs, N., Doel, T., Brown, F., 1978. Relationship of San Miguel sea lion virus to other members of the calicivirus group. *Intervirology* 10, 51-59.
- Cahour, A., Falgout, B., Lai, C. J., 1992. Cleavage of the dengue virus polyprotein at the NS3/NS4A and NS4B/NS5 junctions is mediated by viral protease NS2B-NS3, whereas NS4A/NS4B may be processed by a cellular protease. *J Virol* 66, 1535-1542.
- Cancellotti, F. M., Renzi, M., 1991. Epidemiology and current situation of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome in Italy. *Rev Sci Tech* 10, 409-422.
- Capucci, L., Fallacara, F., Grazioli, S., Lavazza, A., Pacciarini, M. L., Brocchi, E., 1998. A further step in the evolution of rabbit hemorrhagic disease virus: the appearance of the first consistent antigenic variant. *Virus Res* 58, 115-126.
- Capucci, L., Fusi, P., Lavazza, A., Pacciarini, M. L., Rossi, C., 1996. Detection and preliminary characterization of a new rabbit calicivirus related to rabbit hemorrhagic disease virus but nonpathogenic. *J Virol* 70, 8614-8623.
- Carman, J. A., Garner, M. G., Catton, M. G., Thomas, S., Westbury, H. A., Cannon, R. M., Collins, B. J., Tribe, I. G., 1998. Viral haemorrhagic disease of rabbits and human health. *Epidemiol Infect* 121, 409-418.
- Carter, M. J., 1990. Transcription of feline calicivirus RNA. *Arch Virol* 114, 143-152.
- Carter, M. J., Milton, I. D., Meanger, J., Bennett, M., Gaskell, R. M., Turner, P. C., 1992. The complete nucleotide sequence of a feline calicivirus. *Virology* 190, 443-448.
- Casciola-Rosen, L., Rosen, A., Petri, M., Schlissel, M., 1996. Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity: implications for coagulation events and antigenic spread in systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1624-1629.
- Castañón, S., Marín, M. S., Martín-Alonso, J. M., Boga, J. A., Casais, R., Humara, J. M., Ordas, R. J., Parra, F., 1999. Immunization with potato plants expressing VP60 protein protects against rabbit hemorrhagic disease virus. *J Virol* 73, 4452-4455.
- Chambers, T. J., Nestorowicz, A., Amberg, S. M., Rice, C. M., 1993. Mutagenesis of the yellow fever virus NS2B protein: effects on proteolytic processing, NS2B-NS3 complex formation, and viral replication. *J Virol* 67, 6797-6807.
- Clarke, I. N., Lambden, P. R., 1997. The molecular biology of caliciviruses. *J Gen Virol* 78, 291-301.

- Collery, P. M., Mooney, J., O'Conner, M., Nowotny, N., 1995. Rabbit haemorrhagic disease in Ireland. *Vet Rec* 137, 547.
- Cooper, P. D., Agol, V. I., Bachrach, H. L., Brown, F., Ghendon, Y., Gibbs, A. J., Gillespie, J. H., Lonberg-Holm, K., Mandel, B., Melnick, J. L., Mohanty, S. B., Povey, R. C., Rueckert, R. R., Schaffer, F. L., Tyrrell, D. A., 1978. Picornaviridae: Second Report. *Intervirology* 10, 165.
- Cubitt, W. D., Barrett, A. D., 1985. Propagation and preliminary characterization of a chicken candidate calicivirus. *J Gen Virol* 66, 1431-1438.
- Dawson, S., McArdle, F., Bennett, D., Carter, S. D., Bennett, M., Ryvar, R., Gaskell, R. M., 1993. Investigation of vaccine reactions and breakdowns after feline calicivirus vaccination [see comments]. *Vet Rec* 132, 346-350.
- Delmas, B., Rasschaert, D., Godet, M., Gelfi, J., Laude, H., 1990. Four major antigenic sites of the coronavirus transmissible gastroenteritis virus are located on the amino-terminal half of spike glycoprotein S. *J Gen Virol* 71, 1313-1323.
- Dingle, K. E., Lambden, P. R., Caul, E. O., Clarke, I. N., 1995. Human enteric Caliciviridae: the complete genome sequence and expression of virus-like particles from a genetic group II small round structured virus. *J Gen Virol* 76, 2349-2355.
- Donnelly, M. L., Gani, D., Flint, M., Monaghan, S., Ryan, M. D., 1997. The cleavage activities of aphthovirus and cardiovirus 2A proteins. *J Gen Virol* 78, 13-21.
- Dougherty, W. G., Semler, B. L., 1993. Expression of virus-encoded proteinases: functional and structural similarities with cellular enzymes. *Microbiol Rev* 57, 781-822.
- Dower, W. J., Miller, J. F., Ragsdale, C. W., 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16, 6127-6145.
- Dunham, D. M., Jiang, X., Berke, T., Smith, A. W., Matson, D. O., 1998. Genomic mapping of a calicivirus VPg. *Arch Virol* 143, 2421-2430.
- Ehresmann, D. W., Schaffer, F. L., 1977. RNA synthesized in calicivirus-infected cells is atypical of picornaviruses. *J Virol* 22, 572-576.
- Ehresmann, D. W., Schaffer, F. L., 1979. Calicivirus intracellular RNA: fractionation of 18-22 S RNA and lack of typical 5'-methylated caps on 36 S and 22 S San Miguel sea lion virus RNAs. *Virology* 95, 251-255.
- Failla, C., Tomei, L., De Francesco, R., 1994. Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *J Virol* 68, 3753-3760.
- Failla, C., Tomei, L., De Francesco, R., 1995. An amino-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protease is essential for interaction with NS4A. *J Virol* 69, 1769-1777.
- Falgout, B., Markoff, L., 1995. Evidence that flavivirus NS1-NS2A cleavage is mediated by a membrane-bound host protease in the endoplasmic reticulum. *J Virol* 69, 7232-7243.
- Falgout, B., Miller, R. H., Lai, C. J., 1993. Deletion analysis of dengue virus type 4 nonstructural protein NS2B: identification of a domain required for NS2B-NS3 protease activity. *J Virol* 67, 2034-2042.
- Falgout, B., Pethel, M., Zhang, Y. M., Lai, C. J., 1991. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *J Virol* 65, 2467-2475.

- Falk, M. M., Sobrino, F., Beck, E., 1992. VPg gene amplification correlates with infective particle formation in foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 66, 2251-2260.
- Fastier, L. B., 1957. A new feline virus isolated in tissue culture. *Am J Vet Res* 18, 382-389.
- Fenner, F., 1976. Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology* 7, 1-116.
- Flynn, W. T., Saif, L. J., Moorhead, P. D., 1988. Pathogenesis of porcine enteric calicivirus-like virus in four-day-old gnotobiotic pigs. *Am J Vet Res* 49, 819-825.
- Fretz, M., Schaffer, F. L., 1978. Calicivirus proteins in infected cells: evidence for a capsid polypeptide precursor. *Virology* 89, 318-321.
- Frolich, K., Klima, F., Dedek, J., 1998. Antibodies against rabbit hemorrhagic disease virus in free-ranging red foxes from Germany. *J Wildl Dis* 34, 436-442.
- Fuerst, T. R., Niles, E. G., Studier, F. W., Moss, B., 1986. Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 8122-8126.
- Fuller, H. E., Chasey, D., Lucas, M. H., Gibbens, J. C., 1993. Rabbit haemorrhagic disease in the United Kingdom. *Vet Rec* 133, 611-613.
- Gamarnik, A. V., Andino, R., 1998. Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev* 12, 2293-2304.
- Gaskell, C. J.: *Feline Medicine and Therapeutics*, pp. 257-270, Blackwell Scientific, 1985
- Geissler, K., Parrish, C. R., Schneider, K., Truyen, U., 1999. Feline calicivirus capsid protein expression and self-assembly in cultured feline cells [In Process Citation]. *Vet Microbiol* 69, 63-66.
- Gorbalenya, A. E., Donchenko, A. P., Blinov, V. M., Koonin, E. V., 1989. Cysteine proteases of positive strand RNA viruses and chymotrypsin-like serine proteases. A distinct protein superfamily with a common structural fold [see comments]. *FEBS Lett* 243, 103-114.
- Gorbalenya, A. E., Donchenko, A. P., Koonin, E. V., Blinov, V. M., 1989. N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pestiviruses may be serine proteases. *Nucleic Acids Res* 17, 3889-3897.
- Gosert, R., Dollenmaier, G., Weitz, M., 1997. Identification of active-site residues in protease 3C of hepatitis A virus by site-directed mutagenesis. *J Virol* 71, 3062-3068.
- Grakoui, A., McCourt, D. W., Wychowski, C., Feinstone, S. M., Rice, C. M., 1993. Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *J Virol* 67, 2832-2843.
- Grakoui, A., McCourt, D. W., Wychowski, C., Feinstone, S. M., Rice, C. M., 1993. A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10583-10587.
- Grassmann, C. W., Isken, O., Behrens, S. E., 1999. Assignment of the multifunctional NS3 protein of bovine viral diarrhoea virus during RNA replication: an in vivo and in vitro study. *J Virol* 73, 9196-9205.
- Greeno, E. W., Bach, R. R., Moldow, C. F., 1996. Apoptosis is associated with increased cell surface tissue factor procoagulant activity. *Lab Invest* 75, 281-289.

- Grubman, M. J., Zellner, M., Bablanian, G., Mason, P. W., Piccone, M. E., 1995. Identification of the active-site residues of the 3C proteinase of foot- and-mouth disease virus. *Virology* 213, 581-589.
- Guarne, A., Tormo, J., Kirchweger, R., Pfistermueller, D., Fita, I., Skern, T., 1998. Structure of the foot-and-mouth disease virus leader protease: a papain- like fold adapted for self-processing and eIF4G recognition. *Embo J* 17, 7469-7479.
- Guittre, C., Ruvoen-Clouet, N., Barraud, L., Cherel, Y., Baginski, I., Prave, M., Ganiere, J. P., Trepo, C., Cova, L., 1996. Early stages of rabbit haemorrhagic disease virus infection monitored by polymerase chain reaction. *Zentralbl Veterinarmed [B]* 43, 109-118.
- Guo, M., Chang, K. O., Hardy, M. E., Zhang, Q., Parwani, A. V., Saif, L. J., 1999. Molecular characterization of a porcine enteric calicivirus genetically related to sapporo-like human caliciviruses [In Process Citation]. *J Virol* 73, 9625-9631.
- Hahn, H., Palmenberg, A. C., 1996. Mutational analysis of the encephalomyocarditis virus primary cleavage. *J Virol* 70, 6870-6875.
- Hall, D. J., Palmenberg, A. C., 1996. Mengo virus 3C proteinase: recombinant expression, intergenus substrate cleavage and localization in vivo. *Virus Genes* 13, 99-110.
- Harbour, D. A., Howard, P. E., Gaskell, R. M., 1991. Isolation of feline calicivirus and feline herpesvirus from domestic cats 1980 to 1989. *Vet Rec* 128, 77-80.
- Harris, K. S., Reddigari, S. R., Nicklin, M. J., Hammerle, T., Wimmer, E., 1992. Purification and characterization of poliovirus polypeptide 3CD, a proteinase and a precursor for RNA polymerase. *J Virol* 66, 7481-7489.
- Harris, K. S., Xiang, W., Alexander, L., Lane, W. S., Paul, A. V., Wimmer, E., 1994. Interaction of poliovirus polypeptide 3CDpro with the 5' and 3' termini of the poliovirus genome. Identification of viral and cellular cofactors needed for efficient binding. *J Biol Chem* 269, 27004-27014.
- Hashimoto, M., Roerink, F., Tohya, Y., Mochizuki, M., 1999. Genetic analysis of the RNA polymerase gene of caliciviruses from dogs and cats. *J Vet Med Sci* 61, 603-608.
- Heneidi Zeckua, A., Zepeda Sein, C., Mateos Poumian, A., Velazquez, G., 1997. [Model for evaluating the risk of introducing rabbit viral hemorrhagic disease based on experience in Mexico]. *Rev Sci Tech* 16, 91-103.
- Herbert, T. P., Brierley, I., Brown, T. D., 1996. Detection of the ORF3 polypeptide of feline calicivirus in infected cells and evidence for its expression from a single, functionally bicistronic, subgenomic mRNA. *J Gen Virol* 77, 123-127.
- Herbert, T. P., Brierley, I., Brown, T. D., 1997. Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation. *J Gen Virol* 78, 1033-1040.
- Hijikata, M., Kato, N., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., Shimotohno, K., 1991. Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5547-5551.
- Hijikata, M., Mizushima, H., Akagi, T., Mori, S., Kakiuchi, N., Kato, N., Tanaka, T., Kimura, K., Shimotohno, K., 1993. Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J Virol* 67, 4665-4675.

- Hohdatsu, T., Sato, K., Tajima, T., Koyama, H., 1999. Neutralizing feature of commercially available feline calicivirus (FCV) vaccine immune sera against FCV field isolates. *J Vet Med Sci* 61, 299-301.
- Holden, C., 1995. Rabbit biocontrol project in disarray. *Science* 270, 1123.
- Hoover, E. A., Kahn, D. E., 1975. Experimentally induced feline calicivirus infection: clinical signs and lesions. *J Am Vet Med Assoc* 166, 463-468.
- Huang, H. B., 1991. Vaccination against and immune response to viral haemorrhagic disease of rabbits: a review of research in the People's Republic of China. *Rev Sci Tech* 10, 481-498.
- Jan, L. R., Yang, C. S., Trent, D. W., Falgout, B., Lai, C. J., 1995. Processing of Japanese encephalitis virus non-structural proteins: NS2B- NS3 complex and heterologous proteases. *J Gen Virol* 76, 573-580.
- Jia, X. Y., Summers, D. F., Ehrenfeld, E., 1993. Primary cleavage of the HAV capsid protein precursor in the middle of the proposed 2A coding region. *Virology* 193, 515-519.
- Jiang, X., Cubitt, W. D., Berke, T., Zhong, W., Dai, X., Nakata, S., Pickering, L. K., Matson, D. O., 1997. Sapporo-like human caliciviruses are genetically and antigenically diverse. *Arch Virol* 142, 1813-1827.
- Jiang, X., Matson, D. O., Ruiz-Palacios, G. M., Hu, J., Treanor, J., Pickering, L. K., 1995. Expression, self-assembly, and antigenicity of a snow mountain agent- like calicivirus capsid protein. *J Clin Microbiol* 33, 1452-1455.
- Jiang, X., Wang, M., Wang, K., Estes, M. K., 1993. Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology* 195, 51-61.
- Joachims, M., Harris, K. S., Etchison, D., 1995. Poliovirus protease 3C mediates cleavage of microtubule-associated protein 4. *Virology* 211, 451-461.
- Jore, J., De Geus, B., Jackson, R. J., Pouwels, P. H., Enger-Valk, B. E., 1988. Poliovirus protein 3CD is the active protease for processing of the precursor protein P1 in vitro. *J Gen Virol* 69, 1627-1636.
- Kadoi, K., Kiryu, M., Iwabuchi, M., Kamata, H., Yukawa, M., Inaba, Y., 1997. A strain of calicivirus isolated from lions with vesicular lesions on tongue and snout. *New Microbiol* 20, 141-148.
- Kawaguchi, T., Nomura, K., Hirayama, Y., Kitagawa, T., 1987. Establishment and characterization of a chicken hepatocellular carcinoma cell line, LMH. *Cancer Res* 47, 4460-4464.
- Kean, K. M., Howell, M. T., Grunert, S., Girard, M., Jackson, R. J., 1993. Substitution mutations at the putative catalytic triad of the poliovirus 3C protease have differential effects on cleavage at different sites. *Virology* 194, 360-364.
- Kirchweger, R., Ziegler, E., Lamphear, B. J., Waters, D., Liebig, H. D., Sommergruber, W., Sobrino, F., Hohenadl, C., Blaas, D., Rhoads, R. E. *et al.*, 1994. Foot-and-mouth disease virus leader proteinase: purification of the Lb form and determination of its cleavage site on eIF-4 gamma. *J Virol* 68, 5677-5684.
- König, M., Thiel, H. J., Meyers, G., 1998. Detection of viral proteins after infection of cultured hepatocytes with rabbit hemorrhagic disease virus. *J Virol* 72, 4492-4497.

- Koonin, E. V., Gorbalenya, A. E., Purdy, M. A., Rozanov, M. N., Reyes, G. R., Bradley, D. W., 1992. Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8259-8263.
- Kpodekon, M., Alogninouwa, T., 1998. Control of rabbit viral haemorrhagic disease in Benin by vaccination. *Vet Rec* 143, 693-694.
- Kreutz, L. C., Seal, B. S., 1995. The pathway of feline calicivirus entry. *Virus Res* 35, 63-70.
- Kreutz, L. C., Seal, B. S., Mengeling, W. L., 1994. Early interaction of feline calicivirus with cells in culture. *Arch Virol* 136, 19-34.
- Kusov, Y., Gauss-Muller, V., 1999. Improving proteolytic cleavage at the 3A/3B site of the hepatitis A virus polyprotein impairs processing and particle formation, and the impairment can be complemented in trans by 3AB and 3ABC. *J Virol* 73, 9867-9878.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lambden, P. R., Caul, E. O., Ashley, C. R., Clarke, I. N., 1993. Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus. *Science* 259, 516-519.
- Lambden, P. R., Liu, B., Clarke, I. N., 1995. A conserved sequence motif at the 5' terminus of the Southampton virus genome is characteristic of the Caliciviridae. *Virus Genes* 10, 149-152.
- Laurent, S., Vautherot, J. F., Le Gall, G., Madelaine, M. F., Rasschaert, D., 1997. Structural, antigenic and immunogenic relationships between European brown hare syndrome virus and rabbit haemorrhagic disease virus. *J Gen Virol* 78, 2803-2811.
- Laurent, S., Vautherot, J. F., Madelaine, M. F., Le Gall, G., Rasschaert, D., 1994. Recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in baculovirus self-assembles into viruslike particles and induces protection. *J Virol* 68, 6794-6798.
- Lavazza, A., Scicluna, M. T., Capucci, L., 1996. Susceptibility of hares and rabbits to the European brown hare syndrome virus (EBHSV) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) under experimental conditions. *Zentralbl Veterinarmed [B]* 43, 401-410.
- Lawson, M. A., Semler, B. L., 1990. Picornavirus protein processing--enzymes, substrates, and genetic regulation. *Curr Top Microbiol Immunol* 161, 49-87.
- Le Gall, G., Arnould, C., Boilletot, E., Morisse, J. P., Rasschaert, D., 1998. Molecular epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus outbreaks in France during 1988 to 1995. *J Gen Virol* 79, 11-16.
- Le Gall, G., Huguet, S., Vende, P., Vautherot, J. F., Rasschaert, D., 1996. European brown hare syndrome virus: molecular cloning and sequencing of the genome. *J Gen Virol* 77, 1693-1697.
- Lesk, A. M., Fordham, W. D., 1996. Conservation and variability in the structures of serine proteinases of the chymotrypsin family. *J Mol Biol* 258, 501-537.
- Li, H., Clum, S., You, S., Ebner, K. E., Padmanabhan, R., 1999. The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. *J Virol* 73, 3108-3116.

- Lin, C., Chambers, T. J., Rice, C. M., 1993. Mutagenesis of conserved residues at the yellow fever virus 3/4A and 4B/5 dibasic cleavage sites: effects on cleavage efficiency and polyprotein processing. *Virology* 192, 596-604.
- Liu, B., Clarke, I. N., Caul, E. O., Lambden, P. R., 1997. The genomic 5' terminus of Manchester calicivirus. *Virus Genes* 15, 25-28.
- Liu, B., Clarke, I. N., Lambden, P. R., 1996. Polyprotein processing in Southampton virus: identification of 3C-like protease cleavage sites by in vitro mutagenesis. *J Virol* 70, 2605-2610.
- Liu, B. L., Clarke, I. N., Caul, E. O., Lambden, P. R., 1995. Human enteric caliciviruses have a unique genome structure and are distinct from the Norwalk-like viruses. *Arch Virol* 140, 1345-1356.
- Liu, B. L., Lambden, P. R., Gunther, H., Otto, P., Elschner, M., Clarke, I. N., 1999. Molecular characterization of a bovine enteric calicivirus: relationship to the Norwalk-like viruses. *J Virol* 73, 819-825.
- Liu, B. L., Viljoen, G. J., Clarke, I. N., Lambden, P. R., 1999. Identification of further proteolytic cleavage sites in the Southampton calicivirus polyprotein by expression of the viral protease in *E. coli*. *J Gen Virol* 80, 291-296.
- Liu, S. J., Xue, H. P., Pu, B. Q., Qian, N. H., 1984. A new viral disease in rabbits. *Anim. Hub. Vet. Med.* 16, 253-255.
- Lobigs, M., 1992. Proteolytic processing of a Murray Valley encephalitis virus non- structural polyprotein segment containing the viral proteinase: accumulation of a NS3-4A precursor which requires mature NS3 for efficient processing. *J Gen Virol* 73, 2305-2312.
- Long, G. G., Evermann, J. F., Gorham, J. R., 1980. Naturally occurring picornavirus infection of domestic mink. *Can J Comp Med* 44, 412-417.
- Lugton, I. W., 1999. A cross-sectional study of risk factors affecting the outcome of rabbit haemorrhagic disease virus releases in New South Wales. *Aust Vet J* 77, 322-328.
- Martin Alonso, J. M., Casais, R., Boga, J. A., Parra, F., 1996. Processing of rabbit hemorrhagic disease virus polyprotein. *J Virol* 70, 1261-1265.
- Matson, D. O., Berke, T., Dinulos, M. B., Poet, E., Zhong, W. M., Dai, X. M., Jiang, X., Golding, B., Smith, A. W., 1996. Partial characterization of the genome of nine animal caliciviruses. *Arch Virol* 141, 2443-2456.
- Matson, D. O., Zhong, W. M., Nakata, S., Numata, K., Jiang, X., Pickering, L. K., Chiba, S., Estes, M. K., 1995. Molecular characterization of a human calicivirus with sequence relationships closer to animal caliciviruses than other known human caliciviruses. *J Med Virol* 45, 215-222.
- Matsuura, Y., Tohya, Y., Onuma, M., Roerink, F., Mochizuki, M., Sugimura, T., 2000. Expression and processing of the canine calicivirus capsid precursor. *J Gen Virol* 81, 195-199.
- Matthews, D. A., Smith, W. W., Ferre, R. A., Condon, B., Budahazi, G., Sisson, W., Villafranca, J. E., Janson, C. A., McElroy, H. E., Gribskov, C. L. *et al.*, 1994. Structure of human rhinovirus 3C protease reveals a trypsin-like polypeptide fold, RNA-binding site, and means for cleaving precursor polyprotein. *Cell* 77, 761-771.

- Medina, M., Domingo, E., Brangwyn, J. K., Belsham, G. J., 1993. The two species of the foot-and-mouth disease virus leader protein, expressed individually, exhibit the same activities. *Virology* 194, 355-359.
- Menard, R., Plouffe, C., Laflamme, P., Vernet, T., Tessier, D. C., Thomas, D. Y., Storer, A. C., 1995. Modification of the electrostatic environment is tolerated in the oxyanion hole of the cysteine protease papain. *Biochemistry* 34, 464-471.
- Meyers, G., Wirblich, C., Thiel, H. J., 1991. Genomic and subgenomic RNAs of rabbit hemorrhagic disease virus are both protein-linked and packaged into particles. *Virology* 184, 677-686.
- Meyers, G., Wirblich, C., Thiel, H. J., 1991. Rabbit hemorrhagic disease virus--molecular cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus genome. *Virology* 184, 664-676.
- Mikami, O., Park, J. H., Kimura, T., Ochiai, K., Itakura, C., 1999. Hepatic lesions in young rabbits experimentally infected with rabbit haemorrhagic disease virus. *Res Vet Sci* 66, 237-242.
- Mochizuki, M., Kawanishi, A., Sakamoto, H., Tashiro, S., Fujimoto, R., Ohwaki, M., 1993. A calicivirus isolated from a dog with fatal diarrhoea. *Vet Rec* 132, 221-222.
- Molla, A., Harris, K. S., Paul, A. V., Shin, S. H., Mugavero, J., Wimmer, E., 1994. Stimulation of poliovirus proteinase 3Cpro-related proteolysis by the genome-linked protein VPg and its precursor 3AB. *J Biol Chem* 269, 27015-27020.
- Morisse, J. P., Le Gall, G., Boilletot, E., 1991. Hepatitis of viral origin in Leporidae: introduction and aetiological hypotheses. *Rev Sci Tech* 10, 269-310.
- Mosimann, S. C., Cherney, M. M., Sia, S., Plotch, S., James, M. N., 1997. Refined X-ray crystallographic structure of the poliovirus 3C gene product. *J Mol Biol* 273, 1032-1047.
- Murthy, H. M., Clum, S., Padmanabhan, R., 1999. Dengue virus NS3 serine protease. Crystal structure and insights into interaction of the active site with substrates by molecular modeling and structural analysis of mutational effects. *J Biol Chem* 274, 5573-5580.
- Neill, J. D., Meyer, R. F., Seal, B. S., 1995. Genetic relatedness of the caliciviruses: San Miguel sea lion and vesicular exanthema of swine viruses constitute a single genotype within the Caliciviridae. *J Virol* 69, 4484-4488.
- Neill, J. D., Seal, B. S., 1995. Development of PCR primers for specific amplification of two distinct regions of the genomes of San Miguel sea-lion and vesicular exanthema of swine viruses. *Mol Cell Probes* 9, 33-37.
- Nguyen, V. T., Morange, M., Bensaude, O., 1988. Firefly luciferase luminescence assays using scintillation counters for quantitation in transfected mammalian cells. *Anal Biochem* 171, 404-408.
- Nomoto, A., Kitamura, N., Golini, F., Wimmer, E., 1977. The 5'-terminal structures of poliovirion RNA and poliovirus mRNA differ only in the genome-linked protein VPg. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5345-5349.
- Norsworthy, G. D., 1999. Questions efficacy of vaccinating cats at 3-year intervals. *Am J Vet Res* 60, 918-919.

- Nowak, T., Farber, P. M., Wengler, G., 1989. Analyses of the terminal sequences of West Nile virus structural proteins and of the in vitro translation of these proteins allow the proposal of a complete scheme of the proteolytic cleavages involved in their synthesis. *Virology* 169, 365-376.
- Nowotny, N., Bascunana, C. R., Ballagi-Pordany, A., Gavier-Widen, D., Uhlen, M., Belak, S., 1997. Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease and European brown hare syndrome viruses by comparison of sequences from the capsid protein gene. *Arch Virol* 142, 657-673.
- Ohlinger, V. F., Thiel, H. J., 1991. Identification of the viral haemorrhagic disease virus of rabbits as a calicivirus. *Rev Sci Tech* 10, 311-323.
- O'Keefe, J. S., Tempero, J. E., Motha, M. X., Hansen, M. F., Atkinson, P. H., 1999. Serology of rabbit haemorrhagic disease virus in wild rabbits before and after release of the virus in New Zealand. *Vet Microbiol* 66, 29-40.
- Palmenberg, A. C., 1990. Proteolytic processing of picornaviral polyprotein. *Annu Rev Microbiol* 44, 603-623.
- Palmenberg, A. C., Parks, G. D., Hall, D. J., Ingraham, R. H., Seng, T. W., Pallai, P. V., 1992. Proteolytic processing of the cardioviral P2 region: primary 2A/2B cleavage in clone-derived precursors. *Virology* 190, 754-762.
- Park, J. H., Ochiai, K., Itakura, C., 1992. Detection of rabbit haemorrhagic disease virus particles in the rabbit liver tissues. *J Comp Pathol* 107, 329-340.
- Park, N. Y., Chong, C. J., Kim, J. H., Cho, S. M., Cha, Y. H., Jung, B. T., Kim, D. S., Yoon, J. B., 1987. An outbreak of viral haemorrhagic pneumonia (tentative name) of rabbits in Korea. *J Korean Vet Med Assoc* 23, 603-610.
- Parra, F., Boga, J. A., Marin, M. S., Casais, R., 1993. The amino terminal sequence of VP60 from rabbit hemorrhagic disease virus supports its putative subgenomic origin. *Virus Res* 27, 219-228.
- Parra, F., Prieto, M., 1990. Purification and characterization of a calicivirus as the causative agent of a lethal hemorrhagic disease in rabbits. *J Virol* 64, 4013-4015.
- Parsley, T. B., Cornell, C. T., Semler, B. L., 1999. Modulation of the RNA binding and protein processing activities of poliovirus polypeptide 3CD by the viral RNA polymerase domain. *J Biol Chem* 274, 12867-12876.
- Pearl, L., Blundell, T., 1984. The active site of aspartic proteinases. *FEBS Lett* 174, 96-101.
- Piccone, M. E., Zellner, M., Kumosinski, T. F., Mason, P. W., Grubman, M. J., 1995. Identification of the active-site residues of the L proteinase of foot- and-mouth disease virus. *J Virol* 69, 4950-4956.
- Poet, S. E., Skilling, D. E., Megyesi, J. L., Gilmartin, W. G., Smith, A. W., 1996. Detection of a non-cultivable calicivirus from the white tern (*Gygis alba rothschildi*). *J Wildl Dis* 32, 461-467.
- Poli, A., Nigro, M., Gallazzi, D., Sironi, G., Lavazza, A., Gelmetti, D., 1991. Acute hepatitis in the European brown hare (*Lepus europaeus*) in Italy. *J Wildl Dis* 27, 621-629.

- Prasad, B. V., Rothnagel, R., Jiang, X., Estes, M. K., 1994. Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids. *J Virol* 68, 5117-5125.
- Prasad, B. V. V., Hardy, M. E., Dokland, T., Bella, J., Rossmann, M. G., Estes, M. K., 1999. X-ray Crystallographic Structure of the Norwalk Virus Capsid. *Science* 286, 287-290.
- Pringle, C. R., 1999. Virus taxonomy at the XIth international congress of virology, sydney, australia, 1999 [In Process Citation]. *Arch Virol* 144, 2065-2070.
- Probst, C., Jecht, M., Gauss-Muller, V., 1998. Processing of proteinase precursors and their effect on hepatitis A virus particle formation. *J Virol* 72, 8013-8020.
- Ramiro-Ibanez, F., Martin-Alonso, J. M., Garcia Palencia, P., Parra, F., Alonso, C., 1999. Macrophage tropism of rabbit hemorrhagic disease virus is associated with vascular pathology. *Virus Res* 60, 21-28.
- Rasschaert, D., Huguet, S., Madelaine, M. F., Vautherot, J. F., 1995. Sequence and genomic organization of a rabbit hemorrhagic disease virus isolated from a wild rabbit. *Virus Genes* 9, 121-132.
- Rinehart-Kim, J. E., Zhong, W. M., Jiang, X., Smith, A. W., Matson, D. O., 1999. Complete nucleotide sequence and genomic organization of a primate calicivirus, Pan-1. *Arch Virol* 144, 199-208.
- Roberts, P. J., Belsham, G. J., 1995. Identification of critical amino acids within the foot-and-mouth disease virus leader protein, a cysteine protease. *Virology* 213, 140-146.
- Rodak, L., Granatova, M., Valicek, L., Smid, B., Vesely, T., Nevorankova, Z., 1990. Monoclonal antibodies to rabbit haemorrhagic disease virus and their use in the diagnosis of infection. *J Gen Virol* 71, 2593-2598.
- Rodak, L., Smid, B., Valicek, L., 1991. Application of control measures against viral haemorrhagic disease of rabbits in the Czech and Slovak Federal Republic. *Rev Sci Tech* 10, 513-524.
- Rumenapf, T., Stark, R., Heimann, M., Thiel, H. J., 1998. N-terminal protease of pestiviruses: identification of putative catalytic residues by site-directed mutagenesis. *J Virol* 72, 2544-2547.
- Ruvoen-Clouet, N., Blanchard, D., Andre-Fontaine, G., Ganiere, J. P., 1995. Partial characterization of the human erythrocyte receptor for rabbit haemorrhagic disease virus. *Res Virol* 146, 33-41.
- Ryan, M. D., Flint, M., 1997. Virus-encoded proteinases of the picornavirus super-group. *J Gen Virol* 78, 699-723.
- Ryan, M. D., King, A. M., Thomas, G. P., 1991. Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence. *J Gen Virol* 72, 2727-2732.
- Ryan, M. D., Monaghan, S., Flint, M., 1998. Virus-encoded proteinases of the Flaviviridae. *J Gen Virol* 79, 947-959.
- Schaffer, F. L., Bachrach, H. L., Brown, F., Gillespie, J. H., Burroughs, J. N., Madin, S. H., Madeley, C. R., Povey, R. C., Scott, F., Smith, A. W., Studdert, M. J., 1980. Caliciviridae. *Intervirology* 14, 1-6.

- Schaffer, F. L., Ehresmann, D. W., Fretz, M. K., Soergel, M. I., 1980. A protein, VPg, covalently linked to 36S calicivirus RNA. *J Gen Virol* 47, 215-220.
- Schechter, I., Berger, A., 1967. The Schechter and Berger nomenclature for the description of protease subsites. *Biochem Biophys Res Com* 27, 157-162.
- Schirrmeier, H., Reimann, I., Kollner, B., Granzow, H., 1999. Pathogenic, antigenic and molecular properties of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) isolated from vaccinated rabbits: detection and characterization of antigenic variants. *Arch Virol* 144, 719-735.
- Seah, E. L., Gunsekere, I. C., Marshall, J. A., Wright, P. J., 1999. Variation in ORF3 of genogroup 2 Norwalk-like viruses. *Arch Virol* 144, 1007-1014.
- Seah, E. L., Marshall, J. A., Wright, P. J., 1999. Open reading frame 1 of the Norwalk-like virus Camberwell: completion of sequence and expression in mammalian cells. *J Virol* 73, 10531-10535.
- Seal, B. S., Lutze-Wallace, C., Kreutz, L. C., Sapp, T., Dulac, G. C., Neill, J. D., 1995. Isolation of caliciviruses from skunks that are antigenically and genotypically related to San Miguel sea lion virus. *Virus Res* 37, 1-12.
- Seipelt, J., Guarne, A., Bergmann, E., James, M., Sommergruber, W., Fita, I., Skern, T., 1999. The structures of picornaviral proteinases. *Virus Res* 62, 159-168.
- Shen, Y., Igo, M., Yalamanchili, P., Berk, A. J., Dasgupta, A., 1996. DNA binding domain and subunit interactions of transcription factor IIIc revealed by dissection with poliovirus 3C protease. *Mol Cell Biol* 16, 4163-4171.
- Sibilia, M., Boniotti, M. B., Angoscini, P., Capucci, L., Rossi, C., 1995. Two independent pathways of expression lead to self-assembly of the rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. *J Virol* 69, 5812-5815.
- Simon, M. C., Muguruza, R., Alonso, J. L., Muzquiz, J. L., Girones, O., Haffar, A., 1994. Recherche du virus de la maladie hémorragique virale du lapin (RHD) chez le renard et rôle des canidés domestiques dans la transmission de la maladie. *Receuil de Médecine Vétérinaire* 170:841-845
- Smith, A. W., Akers, T. G., 1976. Vesicular exanthema of swine. *J Am Vet Med Assoc* 169, 700-703.
- Smith, A. W., Akers, T. G., Madin, S. H., Vedros, N. A., 1973. San Miguel sea lion virus isolation, preliminary characterization and relationship to vesicular exanthema of swine virus. *Nature* 244, 108-110.
- Smith, A. W., Anderson, M. P., Skilling, D. E., Barlough, J. E., Ensley, P. K., 1986. First isolation of calicivirus from reptiles and amphibians. *Am J Vet Res* 47, 1718-1721.
- Smith, A. W., Boyt, P. M., 1990. Caliciviruses of ocean origin: a review. *J Zoo Wildl Med* 21, 3-23.
- Smith, A. W., Skilling, D. E., Cherry, N., Mead, J. H., Matson, D. O., 1998. Calicivirus emergence from ocean reservoirs: zoonotic and interspecies movements [see comments]. *Emerg Infect Dis* 4, 13-20.
- Smith, A. W., Skilling, D. E., Ensley, P. K., Benirschke, K., Lester, T. L., 1983. Calicivirus isolation and persistence in a pygmy chimpanzee (*Pan paniscus*). *Science* 221, 79-81.

- Smith, A. W., Skilling, D. E., Ridgway, S., 1983. Calicivirus-induced vesicular disease in cetaceans and probable interspecies transmission. *J Am Vet Med Assoc* 183, 1223-1225.
- Sommergruber, W., Casari, G., Fessl, F., Seipelt, J., Skern, T., 1994. The 2A proteinase of human rhinovirus is a zinc containing enzyme. *Virology* 204, 815-818.
- Sommergruber, W., Seipelt, J., Fessl, F., Skern, T., Liebig, H. D., Casari, G., 1997. Mutational analyses support a model for the HRV2 2A proteinase. *Virology* 234, 203-214.
- Sosnovtsev, S., Green, K. Y., 1995. RNA transcripts derived from a cloned full-length copy of the feline calicivirus genome do not require VpG for infectivity. *Virology* 210, 383-390.
- Sosnovtsev, S. V., Sosnovtseva, S. A., Green, K. Y., 1998. Cleavage of the feline calicivirus capsid precursor is mediated by a virus-encoded proteinase. *J Virol* 72, 3051-3059.
- Sosnovtseva, S. A., Sosnovtsev, S. V., Green, K. Y., 1999. Mapping of the feline calicivirus proteinase responsible for autocatalytic processing of the nonstructural polyprotein and identification of a stable proteinase-polymerase precursor protein. *J Virol* 73, 6626-6633.
- Stark, R., Meyers, G., Rumenapf, T., Thiel, H. J., 1993. Processing of pestivirus polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. *J Virol* 67, 7088-7095.
- Steitz, T. A., Shulman, R. G., 1982. Crystallographic and NMR studies of the serine proteases. *Annu Rev Biophys Bioeng* 11, 419-444.
- Studdert, M. J., 1978. Caliciviruses. Brief review. *Arch Virol* 58, 157-191.
- Sung, D., Kang, H., 1998. The N-terminal amino acid sequences of the firefly luciferase are important for the stability of the enzyme. *Photochem Photobiol* 68, 749-753.
- Takegami, T., Sakamuro, D., Furukawa, T., 1994. Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS3 has RNA binding and ATPase activities. *Virus Genes* 9, 105-112.
- Tam, A. W., Smith, M. M., Guerra, M. E., Huang, C. C., Bradley, D. W., Fry, K. E., Reyes, G. R., 1991. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 185, 120-131.
- Tautz, N., Elbers, K., Stoll, D., Meyers, G., Thiel, H. J., 1997. Serine protease of pestiviruses: determination of cleavage sites. *J Virol* 71, 5415-5422.
- Thiel, H. J., König, M., 1999. Caliciviruses: an overview. *Vet Microbiol* 69, 55-62.
- Thouvenin, E., Laurent, S., Madelaine, M. F., Rasschaert, D., Vautherot, J. F., Hewat, E. A., 1997. Bivalent binding of a neutralising antibody to a calicivirus involves the torsional flexibility of the antibody hinge. *J Mol Biol* 270, 238-246.
- Tomei, L., Failla, C., Santolini, E., De Francesco, R., La Monica, N., 1993. NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C virus polyprotein. *J Virol* 67, 4017-4026.
- Toyoda, H., Nicklin, M. J., Murray, M. G., Anderson, C. W., Dunn, J. J., Studier, F. W., Wimmer, E., 1986. A second virus-encoded proteinase involved in proteolytic processing of poliovirus polyprotein. *Cell* 45, 761-770.
- Vazquez, A. L., Martin Alonso, J. M., Casais, R., Boga, J. A., Parra, F., 1998. Expression of enzymatically active rabbit hemorrhagic disease virus RNA-dependent RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J Virol* 72, 2999-3004.

- Vernet, T., Tessier, D. C., Chatellier, J., Plouffe, C., Lee, T. S., Thomas, D. Y., Storer, A. C., Menard, R., 1995. Structural and functional roles of asparagine 175 in the cysteine protease papain. *J Biol Chem* 270, 16645-16652.
- Villafuerte, R., Calvete, C., Gortazar, C., Moreno, S., 1994. First epizootic of rabbit hemorrhagic disease in free living populations of *Oryctolagus cuniculus* at Donana National Park, Spain. *J Wildl Dis* 30, 176-179.
- Wardell, A. D., Errington, W., Ciaramella, G., Merson, J., McGarvey, M. J., 1999. Characterization and mutational analysis of the helicase and NTPase activities of hepatitis C virus full-length NS3 protein. *J Gen Virol* 80, 701-709.
- Warshel, A., Naray-Szabo, G., Sussman, F., Hwang, J. K., 1989. How do serine proteases really work? *Biochemistry* 28, 3629-3637.
- Wattre, P., 1994. [Hepatitis E virus (published erratum appears in *Ann Biol Clin (Paris)* 1994;52(11):750)]. *Ann Biol Clin* 52, 507-513.
- White, L. J., Ball, J. M., Hardy, M. E., Tanaka, T. N., Kitamoto, N., Estes, M. K., 1996. Attachment and entry of recombinant Norwalk virus capsids to cultured human and animal cell lines. *J Virol* 70, 6589-6597.
- Wirblich, C., Meyers, G., Ohlinger, V. F., Capucci, L., Eskens, U., Haas, B., Thiel, H. J., 1994. European brown hare syndrome virus: relationship to rabbit hemorrhagic disease virus and other caliciviruses. *J Virol* 68, 5164-5173.
- Wirblich, C., Sibilia, M., Boniotti, M. B., Rossi, C., Thiel, H. J., Meyers, G., 1995. 3C-like protease of rabbit hemorrhagic disease virus: identification of cleavage sites in the ORF1 polyprotein and analysis of cleavage specificity. *J Virol* 69, 7159-7168.
- Wirblich, C., Thiel, H. J., Meyers, G., 1996. Genetic map of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus as deduced from in vitro translation studies. *J Virol* 70, 7974-7983.
- Wu, Z., Yao, N., Le, H. V., Weber, P. C., 1998. Mechanism of autoproteolysis at the NS2-NS3 junction of the hepatitis C virus polyprotein. *Trends Biochem Sci* 23, 92-94.
- Xu, J., Mendez, E., Caron, P. R., Lin, C., Murcko, M. A., Collett, M. S., Rice, C. M., 1997. Bovine viral diarrhea virus NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. *J Virol* 71, 5312-5322.
- Xu, W. Y., 1991. Viral haemorrhagic disease of rabbits in the People's Republic of China: epidemiology and virus characterisation. *Rev Sci Tech* 10, 393-408.
- Yalamanchili, P., Weidman, K., Dasgupta, A., 1997. Cleavage of transcriptional activator Oct-1 by poliovirus encoded protease 3Cpro. *Virology* 239, 176-185.
- Ypma-Wong, M. F., Dewalt, P. G., Johnson, V. H., Lamb, J. G., Semler, B. L., 1988. Protein 3CD is the major poliovirus proteinase responsible for cleavage of the P1 capsid precursor. *Virology* 166, 265-270.
- Ypma-Wong, M. F., Filman, D. J., Hogle, J. M., Semler, B. L., 1988. Structural domains of the poliovirus polyprotein are major determinants for proteolytic cleavage at Gln-Gly pairs. *J Biol Chem* 263, 17846-17856.