

GERVAIS RIOUX

**IDENTIFICATION DES RÉGIONS DE SURFACE
DES NANOPARTICULES DU VIRUS DE LA
MOSAÏQUE DE LA PAPAYE (PAPMV) DANS LE
BUT D'OPTIMISER SON UTILISATION COMME
PLATEFORME VACCINALE**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en Microbiologie-Immunologie
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)

MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2012

Résumé

La surface externe du virus de la mosaïque de la papaye (PapMV) a été caractérisée par deux approches différentes : biochimique et immunologique. Sept régions ont été identifiées. Trois régions de surface (les extrémités N- et C-terminales, ainsi que la région 117 à 136) peuvent être considérées comme étant dominantes puisqu'elles ont été ciblées par les deux approches. Les régions 141-152, 173-184, 189-200 et 205-215 ont été révélées par l'approche immunologique seulement. De plus, un criblage de l'épitope HA11 du virus de l'Influenza à plusieurs sites a permis de valider le potentiel du PapMV à présenter des épitopes en surface. Les extrémités N- et C-terminales et la position 187 supportent l'insertion du peptide HA11 à la surface. Seulement la fusion à l'extrémité N-terminal en position 12 donne des particules stables à température corporelle des animaux et permettent de lever une réponse immunitaire contre le peptide HA11. Donc, la stabilité des nanoparticules est essentielle à l'obtention d'une bonne réponse immunitaire.

Abstract

Surface-exposed regions of Papaya Mosaic Virus (PapMV) were evaluated by two different methods: immunoblot assay and chemical modifications followed by mass spectrometry. Three regions were targeted by both techniques: the N- and C-termini and region 125-136. These regions are therefore considered to be major surface epitopes. Four other regions were only detected by the immunological technique: regions 117-128, 141-152, 173-184 and 189-200. Sites of fusion using the Influenza virus HA11 peptide were evaluated on the PapMV vaccine platform. Fusions of HA11 at three functional sites located after amino acids 12 and 187 and at the C-terminus led to the production of PapMV particles. It was successfully demonstrated that the HA11 epitope was located at the surface of the particles. The stability and immunogenicity of the nanoparticles were evaluated, and a direct correlation was established between the stability of the particles and their ability to trigger an efficient immune response against HA11.

Avant-Propos

Ce mémoire contient deux articles scientifiques qui ont été mes principaux projets de recherche durant mes deux années de maîtrise. Ces deux projets ont été sous ma responsabilité et j'en suis donc l'auteur principal.

J'ai participé à environ 75% de la réalisation du premier projet. J'ai effectué la plupart des expériences du premier article et je tiens à remercier la plateforme de génomique et de protéomique de l'Est du Québec pour les manipulations de spectrométrie de masse ainsi que la plateforme de génomique du Centre de Recherche en Infectiologie (CRI) pour les manipulations avec les micropuces peptidiques qui m'ont été d'une aide précieuse. J'ai écrit le manuscrit sous la supervision de mon directeur Denis Leclerc. Enfin, je tiens à remercier Nathalie Majeau pour ses conseils et sa codirection.

J'ai participé à environ 60% de la réalisation de ce deuxième projet. Les expériences du deuxième article ont été réalisées par Cindy Babin et par moi-même. L'écriture du manuscrit a été réalisée par Denis Leclerc et par moi-même. Nathalie Majeau a supervisé les expériences et a apporté un regard critique sur le manuscrit.

Ces deux articles ont été acceptés pour publication dans des journaux scientifiques avec comité de révision. Le premier dans FEBS Journal et le deuxième dans PLoS One. Les articles sont insérés dans ce mémoire et correspondent à leur contenu publié plus les corrections demandées par les évaluateurs.

J'aimerais finalement remercier toute l'équipe du laboratoire du Dr Denis Leclerc pour son support et son aide précieuse à l'exécution des expériences. Merci aussi à Denis pour ses conseils et sa confiance.

Table des matières

RÉSUMÉ	II
ABSTRACT	III
AVANT-PROPOS	IV
TABLE DES MATIÈRES	VI
LISTE DES TABLEAUX	VIII
LISTE DES FIGURES	IX
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	1
1. LES VIRUS VÉGÉTAUX	1
1.1. <i>Les virus icosaédriques</i>	3
1.2. <i>Les virus hélicoïdaux filamenteux</i>	3
1.3. <i>Les virus hélicoïdaux filamenteux rigides</i>	3
1.4. <i>Les virus filamenteux flexibles et les Potexvirus</i>	4
1.5. <i>Le virus de la mosaïque de la papaye</i>	6
2. L'UTILISATION DES VIRUS DE PLANTE EN VACCINATION	8
2.1. <i>Chez les virus icosaédriques</i>	9
2.2. <i>Chez les virus hélicoïdaux filamenteux</i>	10
2.2.1. <i>Chez les Potexvirus</i>	12
2.2.2. <i>Chez le virus de la mosaïque de la papaye</i>	13
CHAPITRE 2 : ÉVALUATION DES DÉTERMINANTS DE SURFACE DU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DE LA PAPAYE	16
RÉSUMÉ	16
ABSTRACT	18
INTRODUCTION	19
RESULTS	21
DISCUSSION	23
MATERIALS AND METHODS	25
ACKNOWLEDGMENT	29
REFERENCES	30
TABLES	33
FIGURES	35
SUPPLEMENTARY FIGURES	39
CHAPITRE 3 : INGÉNIERIE DU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DE LA PAPAYE PAR FUSION DE L'ÉPITOPE HA11 DANS DES RÉGIONS CONSIDÉRÉES COMME EXPOSÉES À LA SURFACE	42
RÉSUMÉ	42
ABSTRACT	44
INTRODUCTION	45
RESULTS	47
DISCUSSION	51
MATERIALS AND METHODS	54
ACKNOWLEDGMENTS	56
REFERENCES	57
TABLE	59
FIGURES	60
SUPPLEMENTARY FIGURES	66

CHAPITRE 4 : DISCUSSION	68
1. LA SURFACE DU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DE LA PAPAYE	68
2. LA PLATEFORME VACCINALE DU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DE LA PAPAYE	69
CHAPITRE 5 : CONCLUSION	72
BIBLIOGRAPHIE	73
ANNEXE I – SÉQUENCES DES CLONES HA11	80
ANNEXE II – MILIEUX ET TAMPONS	88
ANNEXE III – PRODUCTION ET PURIFICATION DU PAPMV	90

Liste des tableaux

Tableau 1-1 : Divers épitopes insérés à la surface du Tobacco Mosaic Virus (TMV)	11
Table 2-1: PapMV coat protein peptide list.	33
Table 2-2: Antibodies against peptides confirmed to be at the surface of PapMV nanoparticles.....	34
Table 3-1. Forward and reverse oligonucleotides used to produce the seven PapMV-HA11 recombinant proteins.....	59

Liste des figures

Figures :

Figure 1-1 : Images en microscopie électronique illustrant les diverses formes de virus végétaux.	2
Figure 1-2 : Représentation 3D du « Tobacco Mosaic Virus ».....	4
Figure 1-3 : Image en microscopie électronique à transmission du « Potato Virus Y », un <i>Potyvirus</i>	5
Figure 1-4 : Structure du « Potato Virus X ».....	6
Figure 1-5 : Particules virales non-infectieuses du PapMV produites in vitro.	8
Figure 2-1: Immunodot blot against peptides array derived from the coat protein of PapMV.	35
Figure 2-2: MS/MS spectra of digested peptides containing chemical modifications by EDC.	36
Figure 2-3: MS/MS spectra of digested peptides containing chemical modifications by DEPC.	37
Figure 2-4: Summary of the results of the two techniques and the predicted secondary structure. ...	38
Figure 3-1. PapMV amino acid sequence and structure.	60
Figure 3-2. PapMV-HA11 recombinant proteins.	61
Figure 3-3. Immunoprecipitation and western blot of PapMV with or without HA11 fusion.....	62
Figure 3-4. Structural changes in PapMV CP in the different recombinant nanoparticles induced by an increase in temperature.	63
Figure 3-5. Aggregation of recombinant nanoparticles upon heating.	64
Figure 3-6. Stable nanoparticles are more immunogenic in animals.	65

Figures supplémentaires :

Figure S2-1 : Immunodot blot of PapMV nanoparticles.....	39
Figure S2-2: Individual immunodot blot of 5 mice immunized with PapMV nanoparticles.....	40
Figure S2-3: Electron microscopy and dynamic light scattering of chemically modified VLPs.....	41
Figure S3-1. Stability of PapMV-M2e-C nanoparticles.	66
Figure S3-2. Immune response after one immunization.	67

Chapitre 1 : Introduction

1. Les virus végétaux

À l'heure actuelle, plus de 2500 virus végétaux de types et de formes variées sont connus. Ils sont impliqués dans plusieurs maladies végétales, bien que les pertes de rendement attribuables aux infections virales restent marginales par rapport aux dommages provoqués par les insectes et par les maladies bactériennes et fongiques (Pallas and García, 2011). Ces virus végétaux sont regroupés selon la nature de leurs acides nucléiques, qui peut être formé d'ADN ou d'ARN simple ou double brin. Ces acides nucléiques codent pour des protéines structurales et pour des protéines impliquées dans le cycle viral et dans le transport entre cellules. La capsidie des virus peut être formée d'une seule ou de plusieurs protéines structurales.

La très vaste majorité des virus végétaux sont non-enveloppés et leur matériel génétique est protégé par un ou plusieurs types de protéines de la capsidie virale, ce qui en font des structures extrêmement robustes (Lomonossoff and Evans, 2011; Steinmetz and Evans, 2007). La capsidie virale consiste en une ou plusieurs protéines interagissant et s'assemblant entre elles. Ces protéines utilisent le matériel génétique comme site de nucléation, menant à la formation d'une particule virale infectieuse. L'encapsidation par les protéines de la capsidie donne ainsi la forme et l'aspect au virus. La forme des virus végétaux est dictée par les interactions des sous-unités qui forment les capsides. Ils peuvent ainsi être icosaédriques, hélicoïdales filamenteux, isométriques ou bacilliformes (Figure 1-1) (Koenig and Lesemann, 2001). Les virus à ARN simple brin représentent la majorité des virus connus et étudiés (Lomonossoff and Evans, 2011; Takanami, 2006) et sont divisés en deux catégories : les virus icosaédriques et les virus hélicoïdaux filamenteux.

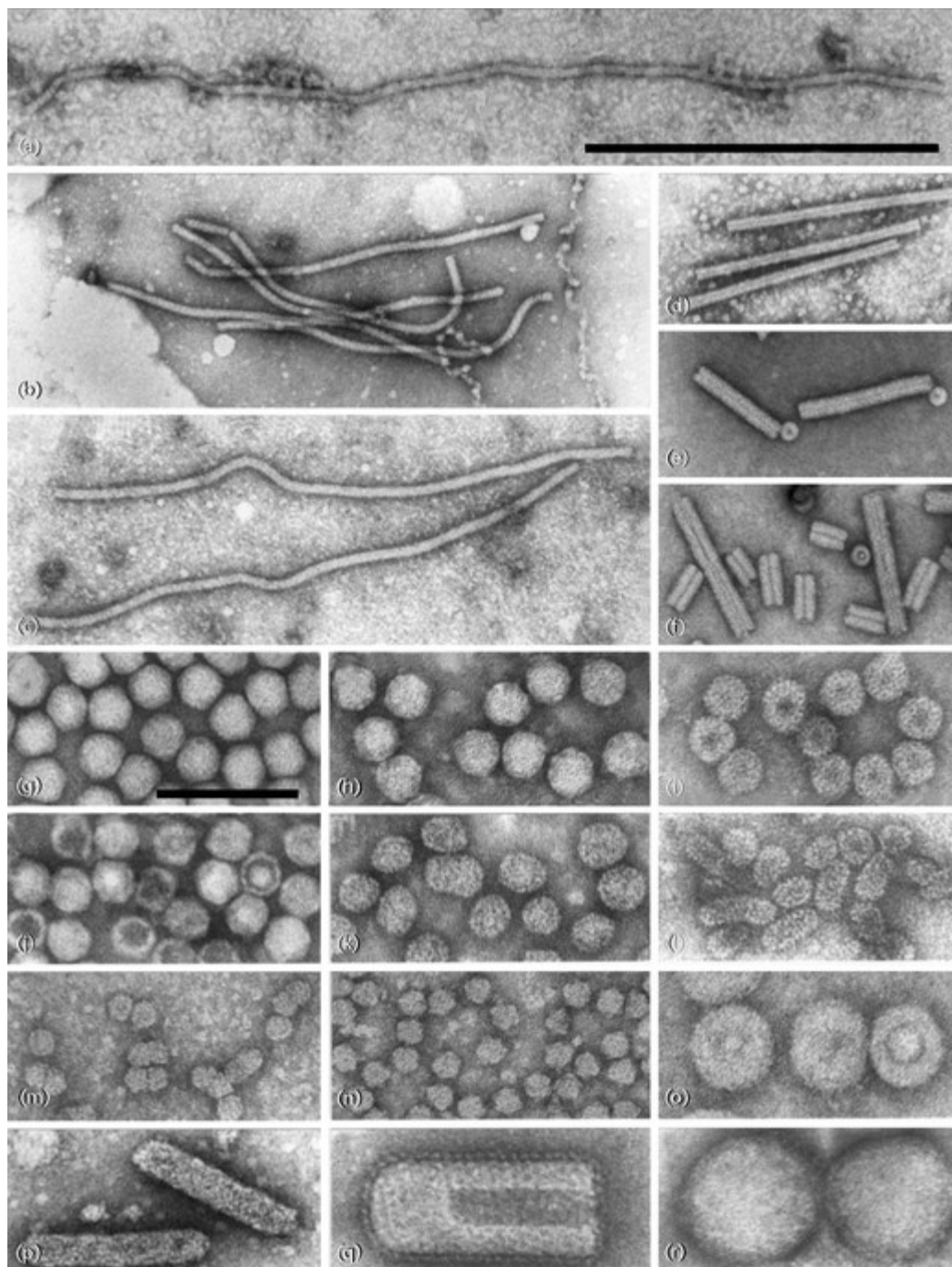


Figure 1-1 : Images en microscopie électronique illustrant les diverses formes de virus végétaux.

« Beet yellows Closterovirus » (a), « potato X Potexvirus » (b), « potato Y Potyvirus » (c), « tobacco mosaic Tobamovirus » (d), « barley stripe mosaic Hordeivirus » (e), « tobacco rattle Tobravirus » (f), « aize chlorotic mottle Machlomovirus » (g), « barley yellow dwarf Luteovirus » (h), « cucumber mosaic Cucumovirus » (i), « arabis mosaic Nepovirus » (j), « apple mosaic Ilarvirus » (k), « alfalfa mosaic Alfamovirus » (l), « tomato yellow leaf curl Begomovirus » (m), « faba bean necrotic yellows Nanovirus » (n), « cauliflower mosaic Caulimovirus » (o), « cacao swollen shoot Badnavirus » (p), « Laelia red leaf spot-type Rhabdovirus » (q), et « tomato spotted wilt Tospovirus » (r). (Koenig and Lesemann, 2001)

1.1. Les virus icosaédriques

Parmi les virus de plante icosaédriques, le « Cowpea Mosaic Virus » (CPMV) est l'un des plus étudié au point de vue structural. De par les connaissances acquises sur le CPMV, il est possible d'affirmer que la capsid des virus icosaédriques est principalement constituée de deux sous-unités : la « small » (S) et la « large » (L). Les virus sont composés de 60 de chacune de ces deux sous-unités et celles-ci s'assemblent pour former des particules virales ayant 20 faces (Lomonossoff and Johnson, 1991; Steinmetz et al., 2009).

1.2. Les virus hélicoïdaux filamenteux

Un autre important groupe de virus de plantes à ARN simple brin sont les virus hélicoïdaux filamenteux. Ce groupe est lui-même divisé en deux sous-familles : les virus filamenteux flexibles et les virus filamenteux rigides. Considérant l'importante littérature y faisant mention, le « Tobacco Mosaic Virus » (TMV), membre de la famille des *Virgaviridae* et du genre des *Tobamovirus*, est le principal représentant des virus filamenteux rigide. Pour sa part, le « Potato Virus X » (PVX), membre de la famille des *Flexiviridae* et du genre des *Potexvirus*, est le représentant des virus filamenteux flexibles. Ces virus forment de longs filaments contenant leur matériel génétique sous forme d'ARN simple brin à polarité positive (Figure 1-1 (b) et (d)).

1.3. Les virus hélicoïdaux filamenteux rigides

Les principaux genres des virus végétaux filamenteux rigides sont les *Furovirus*, les *Hordeivirus*, les *Pechivirus*, les *Pomovirus*, les *Tobamovirus* et les *Tobravirus* (Adams et al., 2009). Le virus de cette famille dont les caractéristiques biologiques et physiques ont été le plus étudié est le « Tobacco Mosaic Virus » (TMV). Ce virus est l'un des premiers virus à avoir été découvert et il a ouvert la voie à l'étude d'un nouveau domaine qui est la virologie (Harrison and Wilson, 1999).

Le TMV est un virus de 300 nm de long et de 18 nm de diamètre et est de forme cylindrique allongée, d'où le nom filamenteux. Les particules virales sont formées de 2000 sous-unités de poids moléculaire d'environ 17.5 kDa (Caspar, 1963). Ces sous-

unités lient l'ARN et interagissent ensemble pour former une particule virale complète. L'acide nucléique du virus, c'est-à-dire l'ARN simple brin, se retrouve ainsi à l'intérieur d'une structure en hélice de dimension déterminée par la longueur du génome (Figure 1-2). L'acide nucléique remplit un trou central de 4 nm de diamètre. La surface du virus correspond à la partie extérieure des sous-unités de capsides qui sont exposées au solvant. Enfin, les extrémités N- et C-terminales ont été identifiées comme étant à la surface des particules virales et elles sont donc exposées au solvant (Stubbs and Kendall, 2012).



Figure 1-2 : Représentation 3D du « Tobacco Mosaic Virus ».

L'acide nucléique est représenté en rouge au bout de la structure en hélice du virus. Adapté de (Namba et al., 1988).

1.4. Les virus filamenteux flexibles et les *Potexvirus*

La catégorie des virus filamenteux contient aussi des virus ayant une certaine flexibilité au niveau de leur structure quaternaire; ces virus sont regroupés en deux familles : les *Potyviridae* et les *Flexiviridae*. Le virus représentatif de cette catégorie, le « Potato Virus X » (PVX), fait partie de la famille des *Flexiviridae* et du genre des *Potexvirus*. Des résultats récents montrent toutefois que la structure des *Potyvirus* de la famille des *Potyviridae* se rapproche très fortement de celle des *Potexvirus* (Stubbs

and Kendall, 2012), ce qui suggère que ces virus partagent des caractéristiques structurales très similaires (Figure 1-3).

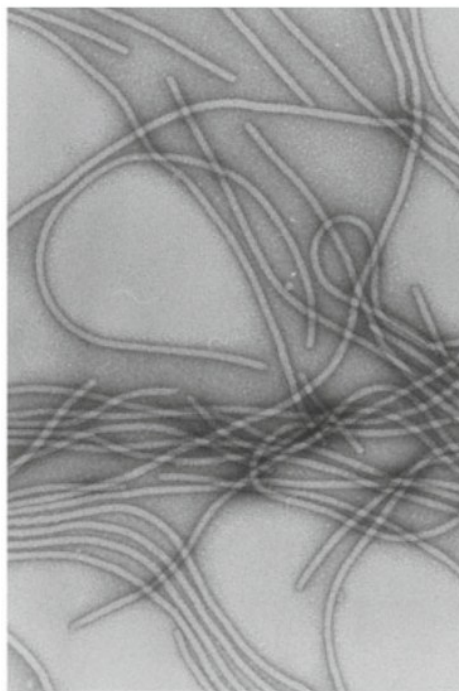


Figure 1-3 : Image en microscopie électronique à transmission du « Potato Virus Y », un *Potyvirus*.
Adaptée de (Stubbs and Kendall, 2012).

Chez les *Potexvirus*, la structure des particules virales du PVX a été établie par cryo-microscopie et par modélisation « iterative helical real-space reconstruction » (Figure 1-3) (Kendall et al., 2008). On remarque que les sous-unités sont arrangées en hélice autour de l'ARN simple brin codant pour le génome du virus. La structure exacte et plus précise de la capsid du PVX n'a cependant pas été déterminée. En fait, aucune étude de la structure en cristallographie de virus flexibles ne s'est révélée fructueuse pour l'instant. Cependant, il a été démontré par tomographie au tritium que l'extrémité N-terminale de la capsid du PVX est exposé à la surface des particules virales (Baratova et al., 1992a; Baratova et al., 1992b). Il est donc possible d'obtenir des caractéristiques structurales en utilisant des techniques moins élaborées, mais réalisables. Plusieurs modèles ont été proposés afin de combler le vide laissé par des résultats infructueux de cristallographie. Le plus récent modèle montre une structure

en sandwich de feuillets β et d'hélices α (Lukashina et al., 2009). La plupart des modèles sont construits à partir de données biochimiques du PVX et quoiqu'ils aient le mérite de fournir des résultats préliminaires sur la structure de ces virus, ils offrent malheureusement très peu de précision et une faible résolution.

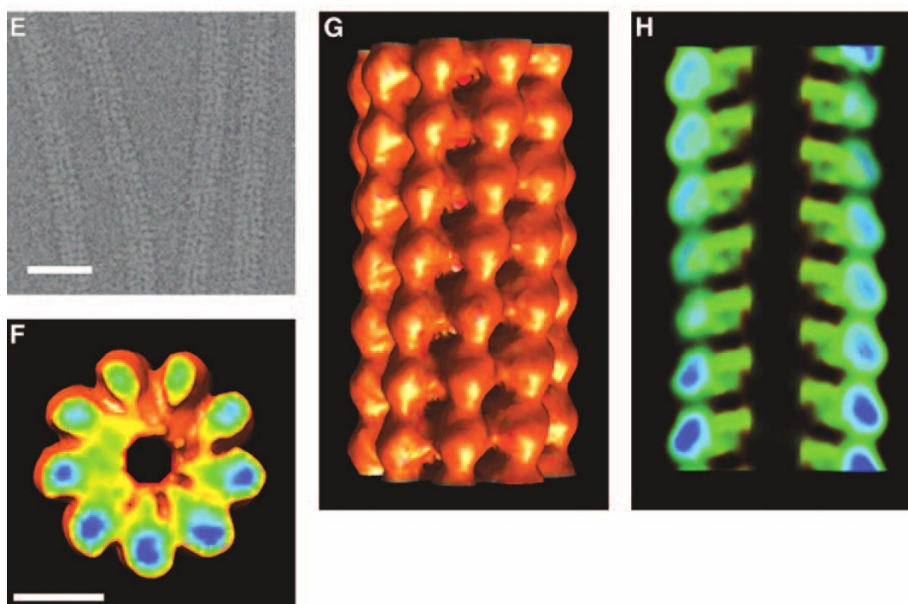


Figure 1-4 : Structure du « Potato Virus X »

Image en cryo-microscopie (E) et reconstruction 3D du PVX (F-H). Adapté de (Kendall et al., 2008)

1.5. Le virus de la mosaïque de la papaye

Le virus de la mosaïque de la papaye (PapMV) est du genre des *Potexvirus* de la grande famille des *Flexiviridae* (Adams et al., 2004). Les particules virales ont une longueur de 500 nm et un diamètre de 13 nm et sont composées de 1400 sous-unités de la protéine de capside (Zhang et al., 1993). Chaque sous-unité de la protéine de capside a une masse moléculaire moyenne de 23 000 Da et est formée de 215 acides aminés. Les sous-unités entourent le génome viral qui consiste en un ARN simple brin à polarité positive de 6656 nucléotides (Sit et al., 1989).

L'assemblage *in vitro* de la capside du PapMV avec son ARN nécessite des conditions expérimentales rigoureuses. Ainsi, un assemblage spécifique envers l'ARN du PapMV ou des virus proches est obtenu lorsque les monomères de la capside sont incubés à pH 8.0, tandis que des particules plus ou moins tubulaires

peuvent être obtenues lorsque l'assemblage est effectué à pH 6.0 avec des ARN homologues ou hétérologues (Erickson et al., 1978). La capsidite nécessite une région d'initiation d'assemblage essentielle à son élongation en virus mature. Cette région se retrouve dans les 200 premiers nucléotides de la région 5' de l'ARN virale du PapMV et est riche en adénine (Abouhaidar and Bancroft, 1978).

De nombreuses études biochimiques ont été effectuées sur des mutants de la capsidite afin de vérifier les effets de mutations spécifiques sur les particules virales (Laliberté Gagné et al., 2008; Tremblay et al., 2006). En fait, l'élaboration de protocoles afin de produire des sous-unités de la capsidite virale du PapMV en bactéries a fortement encouragé son étude (Tremblay et al., 2006). De plus, la production *in vitro* de la protéine de la capsidite sous sa forme monomérique a permis d'établir les conditions nécessaires afin de faire du NMR pour en obtenir la structure tridimensionnelle (Lecours et al., 2006). Une délétion de 26 acides aminés de l'extrémité N-terminale doit cependant être effectuée afin d'obtenir une bonne quantité de sous-unités monomériques.

Il est ainsi possible de produire *in vitro* des particules virales non-infectieuses qui imitent la structure du virus sauvage, mais dont la longueur est réduite par l'utilisation d'un ARN de plus faible masse moléculaire que celui du virus pour l'auto-assemblage (Figure 1-4). Les études sur des événements d'assemblage effectués *in vitro* avec la capsidite du PapMV ont permis d'améliorer la compréhension de l'implication de certains résidus aminés dans l'interaction entre les sous-unités et les acides nucléiques. Par exemple, le résidu F13 a été identifié comme ayant un rôle majeur dans l'interaction entre les sous-unités des particules du PapMV. Ce résidu s'est avéré d'une importance capitale par la création d'un lien hydrophobe entre les sous-unités (Laliberté Gagné et al., 2008). De plus, une mutation du résidu K97 en alanine a permis d'identifier cet acide aminé comme étant un joueur important dans l'interaction des sous-unités avec l'ARN simple brin puisqu'il sert de site de nucléation pour l'assemblage (Tremblay et al., 2006).

En contrepartie, l'insertion d'un marqueur de 6XHis à l'extrémité C-terminale est nécessaire afin d'obtenir une bonne quantité de protéines ayant une pureté

appréciable. Cette insertion est disponible à la surface des particules virales non-infectieuses, ce qui permet de conclure que l'extrémité C-terminale est assurément en surface (Tremblay et al., 2006).

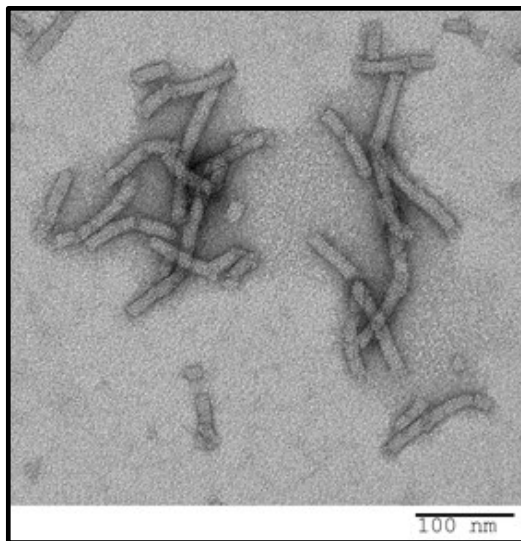


Figure 1-5 : Particules virales non-infectieuses du PapMV produites in vitro.

2. L'utilisation des virus de plante en vaccination

Les virus de plantes ont surtout été étudiés pour leur implication dans plusieurs maladies chez les plantes, mais aussi pour leur potentiel en biotechnologie (Young et al., 2008). En effet, les virus peuvent être utilisés en tant que véhicule pour des composés pharmacologiques, mais aussi en vaccination. Les virus de plante sont non-infectieux envers des organismes autres que les plantes et ne représentent donc pas de dangers immédiats (Leclerc, 2011; Steinmetz and Evans, 2007). Une des utilisations principales des virus de plantes en vaccination a été de les coupler à des antigènes pour en faire des plateformes vaccinales (Leclerc, 2011; Lomonosoff and Evans, 2011). Ce couplage se fait majoritairement par génie génétique. Lorsqu'une fusion est correctement insérée, ces virus chimériques ont la particularité d'exposer un épitope à leur surface afin d'induire une réponse immunitaire humorale forte contre cet épitope.

L'avantage des virus végétaux vient du fait que ceux-ci se multimérisent et forment une structure complexe, cristalline et hautement répétitive. Cette structure permet de

présenter un épitope au système immunitaire en plusieurs copies ordonnées, ce qui augmente son immunogénicité (Bachmann et al., 1993). De plus, les particules virales chimériques peuvent être facilement produites chez les plantes ou en bactéries en très grande quantité (Leclerc, 2011; Lomonossoff and Evans, 2011; Steinmetz and Evans, 2007). Cette capacité de production massive rend ces plateformes vaccinales extrêmement économiques. La production de particules virales en plante présente cependant quelques limitations. Les modifications de la capsid virale par des fusions d'épitopes d'intérêts en vaccination, par exemple, peut perturber les événements essentiels à l'amplification de virus chimériques. En effet, la capsid virale des virus végétaux est souvent impliquée dans la réplication du virus ou dans son transport de cellules en cellules (Callaway et al., 2001; Forster et al., 1992; Lee et al., 2011; Ozeki et al., 2009; Verchot-Lubicz et al., 2007). De plus, les virus à ARN mutent et évoluent rapidement lorsqu'ils se répliquent dans les plantes. Il y a donc un haut risque de mutations de l'épitope ou de sa délétion du génome recombinant. Conséquemment, les portions ne participant pas à la réplication du virus sont souvent éliminées. Néanmoins, lorsque les virus chimériques conservent leur capacité à infecter leur hôte, cette technique de production permet d'obtenir une quantité importante et à faible coût des virus chimériques modifiés.

Finalement, une fusion dans la capsid virale ne doit pas interférer avec le processus d'assemblage viral. L'avantage de l'expression des protéines de capsid dans un système bactérien est que la production de la protéine ne dépend pas de la réplication virale ou du transport de cellules en cellules. Cependant, la protéine chimérique doit être capable de s'assembler en particules pseudo-virales puisque la structure virale est très importante comme plateforme vaccinale. Enfin, cette fusion doit être exposée en surface afin d'être reconnue par les cellules de l'immunité et ainsi induire une forte réponse humorale.

2.1. Chez les virus icosaédriques

Il existe plusieurs types de virus de plantes qui ont été utilisés comme plateforme vaccinale. Plusieurs formes virales peuvent ainsi servir à présenter des antigènes au

système immunitaire. Par exemple, le virus végétal icosaédrique, « Cowpea Mosaic Virus » (CPMV) produit en plante a permis d'obtenir des anticorps contre des épitopes de 17 à 34 acides aminés (Liu et al., 2005; Porta et al., 1994; Usha et al., 1993). Les réponses immunitaires contre ces épitopes ont permis de protéger contre des maladies virales et bactériennes létales. Cependant, un inconvénient de l'utilisation du CPMV comme plateforme vaccinale est que son génome est sectionné en deux ARN simple brin, ce qui rend son utilisation complexe dans un système de production végétale. De plus, certaines fusions sont disparues à la suite des passages successifs des virus chimériques (Brennan et al., 2001; Porta et al., 1994).

Un autre virus végétal icosaédrique, le « Tomato bushy stunt virus » (TBSV), a été utilisé pour exposer par fusion 180 copies d'un peptide de 16 acides aminés à l'extrémité C-terminale (Kumar et al., 2009). Dans ce modèle, la capsid virale du TBSV a été produite dans des cellules d'insectes, où l'on retrouve de l'auto-assemblage durant l'expression de la protéine.

2.2. Chez les virus hélicoïdaux filamenteux

D'autres types de virus ont servi à exposer des épitopes d'intérêt vaccinal, dont le « Tobacco Mosaic Virus » (TMV), qui est un virus filamenteux rigide de la famille des *Virgaviridae*. En fait, c'est en 1986 que la première fusion d'un épitope sur le TMV a été répertoriée; un épitope du poliovirus a été inséré dans la séquence de la capsid de TMV qui fût produite en bactéries (Haynes et al., 1986). Cette plateforme vaccinale permet d'exposer environ 2100 épitopes sur un seul virus, ce qui en fait un outil remarquable afin de présenter un antigène en un nombre élevé de copies. Cette présentation massive d'épitopes permet même de briser la tolérance à certains épitopes du soi (Fitchen et al., 1995). À partir de ces études, de nombreux types d'épitopes ont été insérés à l'extrémité N-terminale de la capsid du TMV, près de ou à l'extrémité C-terminale ou dans une boucle interne (Smith et al., 2009). De plus, la connaissance de la structure tridimensionnelle a permis d'insérer des épitopes de façon rationnelle. Ces épitopes sont d'origine virale, bactérienne, ou proviennent de cellules tumorales (Tableau1-1).

Un virus de la famille des *Potyviridae*, le « Potato Virus Y », émerge présentement comme une nouvelle plateforme vaccinale pouvant servir à la présentation d'antigènes. Il a été démontré que ces particules virales produites en bactéries permettent l'insertion d'épitopes à l'extrémité N-terminale de la capsid virale, mais que l'insertion à l'extrémité C-terminale de la capsid produit des agrégats de protéines dénaturées (Kalnciema et al., 2011). En contrepartie, l'insertion d'un épitope à l'extrémité N-terminale diminue la stabilité thermique des particules virales mais n'affecte pas l'aspect général des particules.

Tableau 1-1 : Divers épitopes insérés à la surface du Tobacco Mosaic Virus (TMV)

Adapté de (Smith et al., 2009)

Vaccine model	Summary of results	Reference
Malaria B cell epitope	Successful display of epitope from malaria on the surface of TMV. High yield in field production	Turpen et al. 1995
Mouse zona pellucida ZP3 epitope, a model contraceptive vaccine	Vaccination was able to break B cell tolerance and induce autoreactive antibodies that recognized zona pellucida located in mouse ovaries. This study is the first and only published account of the use of a plant virus particle to break immune tolerance	Fitchen et al. 1995
Murine hepatitis coronavirus neutralizing epitope	Five of six vaccinated mice were protected from challenge with murine hepatitis virus	Koo et al. 1999
Feline panleukopenia parvovirus epitope	Vaccinated cats were partially protected against challenge with feline panleukopenia parvovirus	Pogue et al. 2004
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> OMPF peptide	Vaccinated mice had reduced lesion number and disease severity when challenged with <i>Pseudomonas</i>	Staczek et al. 2000
Foot and mouth disease virus neutralizing epitope	Guinea pigs and swine protected against challenge with FMDV	Wu et al. 2003
Rabbit papillomavirus L2 Imer epitopes	Full protection against homologous virus challenge; some cross-protective immunity between papillomavirus types	Palmer et al. 2006
Mouse tumor T Cell epitopes	Induced T cell responses that protected mice against tumor challenge	McCormick et al. 2006

2.2.1. Chez les *Potexvirus*

Des virus filamenteux de la famille des *Alphaflexiviridae* et du genre des *Potexvirus* ont aussi été exploités comme plateforme vaccinale. De ceux-ci, le « Bamboo Mosaic Virus » (BaMV) a été produit en plante sous forme de virus chimériques afin d'exposer des épitopes de 37 acides aminés du virus de la fièvre aphteuse (Yang et al., 2007) et des épitopes de 17 acides aminés du virus de la bursite infectieuse (Chen et al., 2012). Cependant, une délétion de 35 acides aminés à l'extrémité N-terminale est nécessaire afin d'accommoder l'insertion de fusions à cet endroit et d'obtenir des particules stables et immunogéniques (Yang et al., 2007). Ces virus chimériques ont permis d'obtenir des anticorps contre les fusions et de protéger les animaux vaccinés contre une infection létale.

Un proche voisin du PapMV, le « Potato Virus X » (PVX), a aussi été utilisé comme plateforme vaccinale. Des fusions ont été effectuées aux extrémités N- et C-terminales et ont permis de produire des particules virales ayant la capacité d'induire une réponse immunitaire humorale forte contre les fusions (Cerovska et al., 2012; Marconi et al., 2006; Marusic et al., 2001; O'Brien et al., 2000; Plchova et al., 2011; Uhde-Holzem et al., 2010; Uhde et al., 2005). Plusieurs fusions avec la plateforme PVX ont été effectuées et ont permis, par exemple, de produire des particules virales ayant une fusion de la protéine VP6 du Rotavirus dans des plantes. Les particules virales chimériques présentent ainsi une protéine virale complète (O'Brien et al., 2000). Une autre équipe a fusionné deux épitopes différents du Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYVV) afin de produire des particules virales chimériques du PVX présentant deux antigènes à la fois (Uhde et al., 2005). Enfin, une récente étude de la plateforme PVX fait état de l'utilisation d'acides aminés séparateurs afin de distancer la fusion et la capsid virale aux extrémités N- et C-terminales. Cette stratégie a permis d'améliorer la reconnaissance de la fusion par des anticorps et de diminuer l'interférence des fusions dans la réaction d'assemblage des particules virales (Plchova et al., 2011).

2.2.2. Chez le virus de la mosaïque de la papaye

Il a été montré que les particules virales du PapMV peuvent être utilisées comme plateforme vaccinale par la fusion d'antigènes peptidiques à l'extrémité C-terminale de la capsid (Denis et al., 2008; Denis et al., 2007; Lacasse et al., 2008; Leclerc et al., 2007). La capacité du PapMV à produire une réponse humorale mémoire a été exploitée pour induire une réponse anticorps contre une fusion d'un épitope du virus de l'hépatite C (Denis et al., 2007). De plus, une fusion du peptide M2e provenant de la protéine M2 du virus de l'Influenza a permis d'induire une réponse humorale protégeant contre une infection avec une dose létale du virus de l'Influenza dans un modèle murin (Denis et al., 2008). L'ensemble de ces fusions a permis de produire des particules virales d'une longueur variant de 60 à 100 nm. Cette caractéristique et l'assemblage des particules virales ont semblé majeurs dans l'initiation d'une réponse immunitaire importante contre l'épitope fusionné. En effet, des sous-unités monomériques possédant une fusion à l'extrémité C-terminale n'induisent pas une forte réponse immunitaire lorsqu'administrés à des souris (Denis et al., 2007). De plus, l'utilisation *in vivo* de protéines du PapMV sous forme de disques composés de 20 sous-unités multimérisées sans acide nucléique induit une très faible réponse immune contre un épitope fusionné (Denis et al., 2008).

Les particules du PapMV portant une fusion induisent une réponse immunitaire équilibrée, de type Th1/Th2. Cette réponse équilibrée suggère que les particules virales du PapMV ont une tendance égale à induire des réponses humorales et cellulaires cytotoxiques. En effet, il a été démontré que les particules virales du PapMV tendent à produire autant des isotypes d'anticorps et de cytokines Th1 que Th2 (Denis et al., 2007). Le PapMV présente donc un avantage vis-à-vis ses homologues viraux, considérant sa versatilité envers la stimulation du système immunitaire.

Les particules virales du PapMV peuvent être utilisées pour présenter des épitopes reconnus par les lymphocytes T et ainsi activer une réponse cytotoxique (Lacasse et al., 2008; Leclerc et al., 2007). En effet, la fusion d'un épitope sur le PapMV permet une présentation croisée de cet épitope et donc une présentation sur le complexe

majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I. Cette forme de présentation permet d'induire une prolifération de lymphocytes T CD8⁺ (Leclerc et al., 2007) qui produisent un effet cytotoxique sur des cellules infectées lors de la présentation de l'épitope duquel ils sont spécifiques. La fusion de l'épitope HLA-A*0201 de la protéine gp 100 d'un mélanome a permis de produire une réponse cytotoxique spécifique contre cet épitope. Il en va de même pour un épitope HLA-A*0201 de la protéine M1 de l'Influenza. En effet, des lymphocytes CD8⁺ spécifiques pour un épitope sont réactifs envers des cellules présentatrices d'antigènes ayant été exposées à du PapMV possédant la fusion de cet épitope (Leclerc et al., 2007). Une fusion de l'épitope cytotoxique p33 d'une glycoprotéine du « lymphocytic choriomeningitis virus » (LCMV) sur le PapMV est suffisante pour obtenir une protection contre une infection au LCMV (Lacasse et al., 2008). En effet, une fusion de cet épitope à l'extrémité C-terminale de la capsid du PapMV permet d'induire une réponse cytotoxique forte contre cet épitope. Enfin, l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome a permis de mettre en évidence que la présentation des antigènes fusionnés au PapMV n'est pas dépendante du protéasome (Leclerc et al., 2007).

Le « Papaya Mosaic Virus » peut aussi être utilisé comme adjuvant simplement en l'ajoutant à un vaccin. Un adjuvant par définition est un composé qui augmente la réponse envers un antigène co-immunisé (Aguilar and Rodríguez, 2007). En effet, la présence du PapMV avec une protéine d'intérêt une préparation vaccinale permet d'augmenter la réponse immunitaire contre cette protéine et d'obtenir une réponse humorale de longue durée. Par exemple, la réponse anticorps contre OmpC, une porine bactérienne issue de *Salmonella typhi*, a été augmentée en présence du PapMV. Cette capacité a même permis d'améliorer la protection contre une infection avec ce pathogène (Acosta-Ramírez et al., 2008).

De plus, une amélioration de la réponse immunitaire contre le vaccin saisonnier de la grippe a été obtenue lorsque celui-ci était administré en présence de particules du PapMV. En fait, ce vaccin contient de nombreuses protéines qui ne sont pas immunogéniques et qui n'induisent pas de réponse immunitaire, d'où la nécessité d'y ajouter un adjuvant. Il a été démontré qu'en présence de l'adjuvant PapMV, les

réponses anticorps et cellulaires envers certains épitopes conservés du virus de l'Influenza, tel que les protéine NP, HA et M1, sont améliorées (Savard et al., 2011). De plus, une réponse humorale plus large contre le vaccin de l'Influenza a été obtenue lorsque les particules du PapMV sont ajoutées à la préparation vaccinale. Cette amélioration du vaccin a permis de protéger contre une infection avec un virus hétéro-sous-typique, c'est-à-dire un virus ne se retrouvant pas dans le vaccin lui-même.

Enfin, la fusion à la surface du PapMV d'un peptide ayant une avidité pour un antigène du virus de l'Influenza, la protéine NP, a permis d'induire une plus forte réponse contre cette protéine (Savard et al., 2012). En effet, l'avidité augmentée du PapMV envers la protéine NP a permis d'augmenter la réponse humorale et d'induire une plus grande sécrétion d'IFN- γ par des lymphocytes T spécifiques à NP, indiquant l'élaboration d'une plus forte réponse cellulaire contre la protéine NP en présence des particules du PapMV. Enfin, une meilleure avidité pour la protéine NP a amélioré la protection contre une infection létale au virus de l'Influenza. Cette protection est caractérisée par une plus faible quantité de virus de l'Influenza dans les poumons des souris infectées.

Chapitre 2 : Évaluation des déterminants de surface du virus de la mosaïque de la papaye

Résumé

Le virus de la mosaïque de la papaye (PapMV) est beaucoup moins étudié au point de vue structural que les autres *Potexvirus*. Sachant que ce virus peut être produit et purifié *in vitro*, il est donc un bon candidat à son étude structural. Ainsi, nous avons évalué les régions de surface du PapMV par deux méthodes différentes : par micropuce peptidique et par modification chimique avec de l'EDC ou du DEPC suivi de spectrométrie de masse. Trois régions ont été ciblées par les deux techniques : les extrémités N- et C-terminales et la région 125-136. Quatre autres régions ont été détectées par la technique immunologique : les régions 117-128, 141-152, 173-184 et 189-200. Toutes ces régions ont été confirmées par dosage immunologique avec des nanoparticules entières, excepté la région 117-125 qui n'a pas été reconnue par les anticorps. La révélation de ces régions de surface est très importante considérant que la nucléocapside a plusieurs rôles dans le cycle viral et dans son utilisation comme adjuvant.

Mapping the Surface-Exposed Regions of Papaya Mosaic Virus Nanoparticles

Gervais RIOUX, Nathalie MAJEAU and Denis LECLERC

Department of Microbiology Infectiology and Immunology, Infectious disease research centre, Laval University, 2705 boul. Laurier, Quebec city, PQ, Canada G1V 4G2

Contact: Phone numbers: (418) 654-2705, Fax numbers: (418) 654-2715, E-mail: Denis.Leclerc@crchul.ulaval.ca

Abstract

In general, the structure of the papaya mosaic virus (PapMV) and other members of the potexviruses is poorly understood. Production of PapMV coat proteins in a bacterial expression system and their self-assembly in vitro into nanoparticles is a very useful tool to study the structure of this virus. Using recombinant PapMV nanoparticles that are similar in shape and appearance to the plant virus, we evaluated surface-exposed regions by two different methods, immunoblot assay and chemical modification with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide or diethylpyrocarbonate followed by mass spectrometry. Three regions were targeted by the two techniques. The N- and C-termini were shown to be surfaced exposed as expected. However, the region 125–136 was revealed for the first time as the major surface-exposed region of the nanoparticles. The presence of linear peptides at the surface was finally confirmed using antibodies directed to those peptides. It is likely that region 125–136 plays a key role in the lifecycle of PapMV and other members of the *Potexvirus* group.

Introduction

Papaya mosaic virus (PapMV)—a member of the genus *Potexvirus* in the large *Flexiviridae* family—is a flexuous 500 nm long and 13 nm in diameter. Each PapMV particle is composed of 1400 subunits of the coat protein (CP) (Zhang et al., 1993) assembled around a positive strand ssRNA of 6656 nucleotides (Sit et al., 1989). The CP is comprised of 215 amino acids and has an estimated molecular mass of 23 kDa. We have previously shown that expression of PapMV CP in bacteria leads to the production of nanoparticles, also known as virus-like particles (VLPs) that can be purified easily using a 6xHis tag fused at the C-terminus of the protein (shown to be exposed on the VLP (Tremblay et al., 2006)). PapMV nanoparticles are non-infectious and resemble wild type purified virus from infected plants in both structure and shape (Tremblay et al., 2006).

This latter production property has proved useful for the further characterization of the biochemical properties of PapMV nanoparticles. For instance, we showed that residue F13 is critical for the self-assembly of PapMV CP subunits into nanoparticles, and that deletion of more than 13 amino acids at the N-terminus completely abolished the ability of CP to self-interact (Laliberté Gagné et al., 2008; Lecours et al., 2006). In another study, we showed that residue K97 is critical for the RNA binding activity of PapMV CP (Tremblay et al., 2006). Interestingly, the substitution E128A leads to the generation of longer nanoparticles due to improved avidity of the protein for the RNA backbone (Tremblay et al., 2006).

Potato virus X, another member of the *Potexvirus* genus, was predicted to present the N-terminus based on a study using tritium planigraphy (Baratova et al., 1992a; Baratova et al., 1992b). In agreement with results obtained from engineering of PapMV nanoparticles (Denis et al., 2008; Denis et al., 2007; Lacasse et al., 2008; Leclerc et al., 2007; Morin et al., 2007), it was shown recently that PVX allows a fusion at the C-terminus to be displayed on the surface of the virus particle (Plchova et al., 2011).

The CP of the *Potexviruses* has been shown to be required for cell-to-cell propagation of the virus within the plant (Verchot-Lubicz, 2005; Verchot-Lubicz et al., 2007). The mechanisms behind this observation are not yet well understood, but a recent study of bamboo mosaic virus (BaMV), another *Potexvirus*, revealed that the helicase of this virus interacts with the surface of the BaMV CP C-terminus, which is believed to be crucial for cell-to-cell movement of the virus (Lee et al., 2011). Therefore, detailed mapping of the surface of a *Potexviruses* is essential for improving our understanding of the life cycle of these viruses, especially with regards to cell-to-cell movement.

Potexvirus nanoparticles can also be used for the development of novel adjuvants (Acosta-Ramírez et al., 2008; Denis et al., 2008; Savard et al., 2011) and vaccine platforms (Denis et al., 2008; Denis et al., 2007; Lacasse et al., 2008; Leclerc et al., 2007). PapMV nanoparticles are recognized as pathogen associated molecular patterns (PAMPs), which can trigger an efficient immune response in animals (Acosta-Ramírez et al., 2008; Savard et al., 2011). Therefore, it is likely that the surface exposed regions of such nanoparticles interact with immune cells, through their surface-exposed regions, providing further justification to better characterize the surface of these macro-molecules. In this study, we mapped the surface of PapMV nanoparticles using two complementary methods: immuno-scanning of peptides array; and chemical modifications followed by mass spectrometry. The results were confirmed by native nanoparticles ELISA with regions-specific antibodies.

Results

Immunoblot of overlapping PapMV CP peptides

A total of 27 overlapping peptides covering the entire open reading frame of the PapMV CP were synthesised and applied to a glass slide (Table 1). Each peptide is 12 amino acids long and is overlapped by 4 amino acids by the subsequent peptide. The array of peptides was then incubated with a pooled polyclonal sera obtained from 5 mice immunized with 2 immunizations of 100 µg PapMV nanoparticles.

The use of a fluorescently labeled secondary anti-mouse serum revealed the peptides that reacted with the pooled sera (Figure S1). As expected and proven in other *Potexvirus*, peptides corresponding to the N- and C-termini were detected by the polyclonal antibodies. In addition, PapMV polyclonal antibodies could also detect (with a high affinity) five other regions corresponding to peptides 15, 16, 18, 22 and 24 (Figure 1). If the same experiment was performed using individual serum from a single mouse, essentially the same results are obtained, but with a variation in the intensity of the signal registered for peptides 18, 22 and 24. However, consistent for all mice, peptides 15 and 16 give a strong signal (Figure S2).

Chemical modifications and mass spectrometry

In order to confirm the immunological results, PapMV nanoparticles were modified chemically at surface-exposed residues and analysed by mass spectrometry. Two low-molecular weight chemicals were used to label the surface of the nanoparticles: 2.0 mM 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) or 0.4 mM diethylpyrocarbonate (DEPC). After removing excess reagents, the modified nanoparticles were analysed by electron microscopy and dynamic light scattering to ensure that their general aspect and length were similar to those of untreated nanoparticles (Figure S3). The nanoparticles were then digested with trypsin and analysed by electrospray mass spectrometry. Approximately 70% of the amino acid sequence of PapMV coat protein could be analyzed for modifications after tryptic digestion. Modifications by EDC and DEPC add 56 Da and 72 Da to the molecular weight of

the peptides, respectively. EDC modifications were found at position D17, E128 and E215 (Figure 2) and DEPC modifications at S135 and T219 (Figure 3) as shown on the MS/MS spectra. The N- and C-termini were also both chemically modified and were therefore confirmed to be located at the surface of PapMV nanoparticles. Interestingly, a central region, E128 and S135, appeared to be exposed at the surface of the nanoparticles as confirmed by immunoblot and MS/MS.

Confirmation of the exposed regions peptides of PapMV nanoparticles by immunization of mice

To reassert that the residues targeted by the antibodies and by chemical modifications were on the surface of PapMV nanoparticles, antibodies against peptides 1, 15, 16, 18, 22, 24 and 26 were produced by fusion to mKLH adjuvant protein. Peptides 13 and 17 were also produced as negative controls. Then, two injections of 100 µg of the linked peptides were injected into mice together with Quil-A adjuvant to obtain a strong immune response. The sera of the selected peptides were then used in ELISAs against native PapMV nanoparticles. All peptides expected to be at the surface were confirmed by high total IgG titers, except peptide 15 (Table 2). The two controls, peptides 13 and 17, were negative, as predicted.

Discussion

We mapped the surface of PapMV nanoparticles using two different methods: immunological and chemical approaches. Seven distinct exposed regions were found, including the already known N- and C-termini. The N- and the C termini and region 117-136 were targeted by both techniques and therefore represent the major surface epitopes of PapMV nanoparticles. Four other regions, 141-152, 173-184, 189-200 and 205-215, were revealed as being surface-exposed by the immunological technique only (Figure 4). According to computer-predicted secondary structure of PapMV CP, the N- and C-termini as well as the five other mapped regions are thought to be located as in a loop in an unstructured region of PapMV CP (Lecours et al., 2006). Finally, we confirmed the surface locations of those regions using an immunological assay. Only peptide 15 (corresponding to amino acids 117-128) failed in this assay. It is possible that the cross-linking of peptide 15 to mKLLH affected the structure of the peptide, or that a region of the peptide was masked by mKLLH.

The immunoblot peptide array appeared to be more sensitive than MS/MS spectroscopy for mapping the surface of nanoparticles. In fact, MS/MS can reveal only those modifications that predominate in the samples and are thus available for cross-linking. We cannot conclude that we have found all regions of PapMV nanoparticles exposed at the surface since the immunoblot technique can react only to linear epitopes presented by the array; the conformational antibodies cannot be detected using this technique. The limitation of MS/MS is related more to the efficiency of labeling of the surface through chemical cross-linking—the context has to be optimal to obtain good and sensitive resolution. It may therefore be possible to improve this performance using other modification agents.

PVX was described as having the N- and C-termini exposed at the surface as shown by epitope fusion (Plchova et al., 2011). Tritium planigraphy analysis of PVX revealed that the N-terminus was the major region subject to modification (Baratova et al., 1992a; Baratova et al., 1992b). Closer examination of these results revealed another region (corresponding to peptide 18) that undergoes significant tritium

labeling that was presented by the authors as background (Baratova et al., 1992b). The authors excluded this region, suggesting it as a possible technical flaw as tritium labeling might have penetrated into the virus. In the light of our results, we suggest that tritium labelling of PVX probably revealed that this region is also surface exposed as in PapMV nanoparticles. This interpretation can be ascribed to the low sensitivity of the tritium labelling technique in evaluating surface-exposed regions of PVX.

Many regions that we identified to be at the surface appear to be involved in cell-to-cell movement. As observed in many *Potexvirus*, the CP is essential for cell-to-cell movements as it has been demonstrated to interact with TGB1, the major *Potexvirus* movement protein (Verchot-Lubicz et al., 2010; Verchot-Lubicz et al., 2007). Even though the N-terminus has long been known to be at the surface in *Potexviruses* (Baratova et al., 1992a; Baratova et al., 1992b), it has only recently been shown to participate in the cell-to-cell movement of *Plantago asiatica* mosaic virus (another member of the *Potexvirus* genus) and that might interact with some host factors (Ozeki et al., 2009). It was also shown that the C-terminus of White Clover Mosaic Virus (CYMV) plays a role in cell-to-cell movement due to a deletion of C-terminal 31 amino acids that abolished this function (Forster et al., 1992). The limit of this deletion corresponds to peptide 22 in the PapMV peptide array. This region was shown to be at the surface in our study. In addition, A209 in BaMV, in the same region as that mapped in CYMV, was also recently shown to be important for cell-to-cell movement (Lee et al., 2011). Thus, these results give useful insights into possible regions that might interact with viral or host proteins in plant infections, and are consistent with our discoveries. Therefore, the link with other surface regions, for instance peptide 16, which has not previously been described elsewhere as located at the surface, might indicate interesting functions in the PapMV life cycle.

Finally, because PapMV nanoparticles can be used as an adjuvant (Acosta-Ramírez et al., 2008; Denis et al., 2008; Savard et al., 2011) and a vaccine platform (Denis et al., 2008; Denis et al., 2007; Lacasse et al., 2008; Leclerc et al., 2007), it will be interesting to evaluate which regions are involved in a specific interaction with the

immune cells in order to decipher the mechanism of induction of the immune response by these macromolecules. We are currently investigating this issue.

Materials and methods

Production of PapMV

PapMV coat proteins and nanoparticles were kindly provided by Folia Biotech. LPS contamination was always less than 50 endotoxin (EU) units/mg of protein.

Peptide synthesis

The entire amino acids sequence of PapMV-CP was synthesised in short peptides by GenScript (Piscataway, NJ, USA) and were used as crude preparation, without HPLC purification. Peptides were 12 amino acids long and overlap by 4 amino acids at each ends with the succeeding and preceding peptides (Table 1). Cysteines in peptide 8 and 13 were change to serines to avoid the possible interference of sulphide bonds with other compounds in the experiments. Peptides containing cysteines were tested afterward without producing any interference.

Immunization of PapMV VLPs and immunodotblot

Five 6 to 8-week-old BALB/c mice were injected subcutaneously with 100 µg of PapMV nanoparticles. A booster shot was given 2 weeks after the first injection and blood samples were obtained 2 weeks after the boost. Peptides were applied in duplicate onto Nexterion-E slides MPX 16 (Schott, Elmsford, NY, USA) following the manufacturer's protocol. Slides were then blocked for 1 hour at room temperature with PBS + Tween®20 0.05% + BSA 1%. Pooled sera from five immunized mice were placed in duplicate on the array at a dilution of 1:100 in blocking buffer for 1 hour at room temperature. The peptides antibodies were detected using Alexa-fluor 647 anti-mouse IgG goat serum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at a dilution of 1:800 for 1 hour. Slides were washed three times between each step with NaCl/P_i + Tween®20 for 3 minutes at room temperature. Glass slides were read using

ScanArray 4000XL (GSI Lumonics) and analysed with GenePix 6.1.0.4 (Molecular devices).

Chemical modifications with DEPC and EDC

PapMV nanoparticles were chemically modified in solution with chemically active compounds that interact selectively with certain amino acids; carboxyl groups with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) (Mendoza and Vachet, 2009); and serine, threonine, histidine and tyrosine with diethylpyrocarbonate (DEPC) (Mendoza and Vachet, 2008, 2009). Both reactions were carried out with 1 mg/ml of PapMV VLPs in a volume of 100 μ l. Briefly, the EDC reaction was performed by adding EDC to obtain a concentration of 2.0 mM in 50 mM glycineamide hydrochloride buffer pH 6.0 and by incubating this reaction at room temperature for 1 hour. The DEPC reaction was performed with a concentration of 0.4 mM DEPC in 50 mM ammonium acetate + 1% acetonitrile solution for 1 minute at 37°C. VLPs were washed by two centrifugations at 14 000 x g for 15 minutes in an Amicon Ultra 10 kDa MWCO 0.5 ml (Millipore, Billerica, MA, USA) with ammonium acetate 50 mM for DEPC and Tris-HCl 10mM pH 8.0 for EDC. The integrity of the VLPs was verified by electron microscopy and dynamic light scattering.

Electron microscopy and dynamic light scattering

Nanoparticles were diluted in water to a concentration of 0.03 mg/ml and stained by mixing 10 μ l of sample with 10 μ l of 3 % acetate-uranyl for 7 minutes in the dark before putting 8 μ l of this solution on carbon-formvar grids for 5 minutes. Grids were observed with a JEOL-1010 transmission electron microscope (Tokyo, Japan). The size of the VLPs was recorded with a ZetaSizer Nano ZS (Malvern, Worcestershire, United Kingdom) at a temperature of 4°C at a concentration of 0.1 mg/ml diluted in PBS 1X.

Protein digestion by trypsin

The digestion and mass spectrometry experiments were performed by the Proteomics platform of the Eastern Quebec Genomics Center, Quebec, Canada. Tryptic digestion

was performed on a MassPrep liquid handling robot (Waters, Milford, USA) according to the manufacturer's specifications and the protocol of Shevchenko et al. (Shevchenko et al., 1996) with the modifications suggested by Havlis et al. (Havlis et al., 2003). Briefly, proteins were reduced with 10mM DTT and alkylated with 55mM iodoacetamide. Trypsin digestion was performed using 105 mM of modified porcine trypsin (Sequencing grade, Promega, Madison, WI) at 58°C for 1h. Digestion products were extracted using 1% formic acid, 2% acetonitrile followed by 1% formic acid, 50% acetonitrile. The recovered extracts were pooled, vacuum centrifuge dried and then resuspended in 7 μ l of 0.1% formic acid; 2 μ l were analyzed by mass spectrometry.

Mass spectrometry of the modified nanoparticles

Peptide samples were separated by online reversed-phase (RP) nanoscale capillary liquid chromatography (nanoLC) and analyzed by electrospray mass spectrometry (ES MS/MS). The experiments were performed with a Thermo Surveyor MS pump connected to a LTQ linear ion trap mass spectrometer (ThermoFisher, San Jose, Ca USA) equipped with a nanoelectrospray ion source (ThermoFisher, San Jose, Ca USA). Peptide separation took place on a self-packed PicoFrit column (New Objective, Woburn, MA) packed with Jupiter (Phenomenex) 5 μ , 300A C18, 10 cm x 0.075 mm internal diameter. Peptides were eluted with a linear gradient from 2-50% solvent B (acetonitrile, 0.1% formic acid) for 30 minutes, at 200 nL/min (obtained by flow-splitting). Mass spectra were acquired using a data dependent acquisition mode using Xcalibur software version 2.0. Each full scan mass spectrum (400 to 2000 m/z) was followed by collision-induced dissociation of the seven most intense ions. The dynamic exclusion (30 seconds exclusion duration) function was enabled, and the relative collisional fragmentation energy was set to 35%.

Database searching

All MS/MS samples were analyzed using Mascot (Matrix Science, London, UK; version 3.1.2). Mascot was set up to search the PapMV-CP amino acid sequence assuming the digestion enzyme trypsin. Mascot was searched with a fragment ion

mass tolerance of 0.50 Da and a parent ion tolerance of 2.0 Da. The iodoacetamide derivative of cysteine was specified as a fixed modification, and oxidation of methionine was specified as a variable modification. Two missed cleavages were allowed.

Criteria for identification of modifications

Scaffold (3.2.0, Proteome Software Inc., Portland, OR) was used to validate MS/MS based peptide and protein identifications. Peptide identifications were accepted if they could be established at greater than 95.0% probability as specified by the Peptide Prophet algorithm (Keller et al., 2002). Modifications were identified by a shift in the peptides mass of 56 Da for EDC and 72 Da for DEPC.

Peptide coupling to mcKLH adjuvant proteins, immunization and ELISA

Peptide linkage to mcKLH was done using the mcKLH linking kit (Pierce, Rockford, IL, USA) with peptides that were described initially at the surface. Immunizations were performed using 100 µg of linked mcKLH with 10 µg of Quil-A saponin (Brenntag Biosector, Denmark) adjuvant for peptides 1, 13, 15, 16, 17, 18, 22, 24 and 26, with a 2-weeks interval before a boost shot. Sera of two mice per peptide were taken at day 28 to assay by native protein ELISA as described elsewhere (Savard et al., 2011) using native PapMV nanoparticles at 0.1 µg/ml as antigens. A titer was considered positive when the optical density was three-folds higher than that of the pre-immune serum.

Ethics Statement

All the work with animals has been done with institution approved ethics protocol by the “Comité de Protection des Animaux - CHUQ (CPA-CHUQ)”. The approval of this project is found under the authorization number 2010148-1.

Acknowledgment

We would like to thank the proteomic platform of the Eastern Quebec Genomics Center for the mass spectrometry experiments, and the Genomic Platform of the Infectious Disease Research Centre for the immunoblot experiments; both are in Quebec City. We also thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) for funding this research program and Helen Rothnie for editing and critical reading of this manuscript.

References

- Acosta-Ramírez, E., Pérez-Flores, R., Majeau, N., Pastelin-Palacios, R., Gil-Cruz, C., Ramírez-Saldaña, M., Manjarrez-Orduño, N., Cervantes-Barragán, L., Santos-Argumedo, L., Flores-Romo, L., Becker, I., Isibasi, A., Leclerc, D., López-Macias, C., 2008. Translating innate response into long-lasting antibody response by the intrinsic antigen-adjuvant properties of papaya mosaic virus. *Immunology* 124, 186-197.
- Baratova, L.A., Grebenschikov, N.I., Dobrov, E.N., Gedrovich, A.V., Kashirin, I.A., Shishkov, A.V., Efimov, A.V., Järvekülg, L., Radavsky, Y.L., Saarma, M., 1992a. The organization of potato virus X coat proteins in virus particles studied by tritium planigraphy and model building. *Virology* 188, 175-180.
- Baratova, L.A., Grebenschikov, N.I., Shishkov, A.V., Kashirin, I.A., Radavsky, J.L., Järvekülg, L., Saarma, M., 1992b. The topography of the surface of potato virus X: tritium planigraphy and immunological analysis. *Journal of General Virology* 73, 229-235.
- Denis, J., Acosta-Ramirez, E., Zhao, Y., Hamelin, M.-E., Koukavica, I., Baz, M., Abed, Y., Savard, C., Pare, C., Lopez Macias, C., Boivin, G., Leclerc, D., 2008. Development of a universal influenza A vaccine based on the M2e peptide fused to the papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform. *Vaccine* 26, 3395-3403.
- Denis, J., Majeau, N., Acosta-Ramirez, E., Savard, C., Bedard, M.-C., Simard, S., Lecours, K., Bolduc, M., Pare, C., Willems, B., Shoukry, N., Tessier, P., Lacasse, P., Lamarre, A., Lapointe, R., Lopez Macias, C., Leclerc, D., 2007. Immunogenicity of papaya mosaic virus-like particles fused to a hepatitis C virus epitope: Evidence for the critical function of multimerization. *Virology* 363, 59-68.
- Forster, R.L.S., Beck, D.L., Guilford, P.J., Voot, D.M., Van Dolleweerd, C.J., Andersen, M.T., 1992. The coat protein of white clover mosaic potexvirus has a role in facilitating cell-to-cell transport in plants. *Virology* 191, 480-484.
- Havlis, J., Thomas, H., Sebela, M., Shevchenko, A., 2003. Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. *Anal Chem* 75, 1300-1306.
- Keller, A., Nesvizhskii, A.I., Kolker, E., Aebersold, R., 2002. Empirical Statistical Model To Estimate the Accuracy of Peptide Identifications Made by MS/MS and Database Search. *Analytical Chemistry* 74, 5383-5392.
- Lacasse, P., Denis, J., Lapointe, R., Leclerc, D., Lamarre, A., 2008. Novel Plant Virus-Based Vaccine Induces Protective Cytotoxic T-Lymphocyte-Mediated Antiviral Immunity through Dendritic Cell Maturation. *J. Virol.* 82, 785-794.

Laliberté Gagné, M.E., Lecours, K., Gagné, S., Leclerc, D., 2008. The F13 residue is critical for interaction among the coat protein subunits of papaya mosaic virus. *FEBS Journal* 275, 1474-1484.

Leclerc, D., Beauseigle, D., Denis, J., Morin, H., Pare, C., Lamarre, A., Lapointe, R., 2007. Proteasome-Independent Major Histocompatibility Complex Class I Cross-Presentation Mediated by Papaya Mosaic Virus-Like Particles Leads to Expansion of Specific Human T Cells. *J. Virol.* 81, 1319-1326.

Lecours, K., Tremblay, M.-H., Gagné, M.-E.L., Gagné, S.M., Leclerc, D., 2006. Purification and biochemical characterization of a monomeric form of papaya mosaic potexvirus coat protein. *Protein Expression and Purification* 47, 273-280.

Lee, C.-C., Ho, Y.-N., Hu, R.-H., Yen, Y.-T., Wang, Z.-C., Lee, Y.-C., Hsu, Y.-H., Meng, M., 2011. The interaction between Bamboo mosaic virus replication protein and coat protein is critical for virus movement in plant hosts. *J. Virol.*, JVI.05595-05511.

Mendoza, V.L., Vachet, R.W., 2008. Protein Surface Mapping Using Diethylpyrocarbonate with Mass Spectrometric Detection. *Analytical Chemistry* 80, 2895-2904.

Mendoza, V.L., Vachet, R.W., 2009. Probing protein structure by amino acid-specific covalent labeling and mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 28, 785-815.

Morin, H., Tremblay, M.-H., Plante, É., Paré, C., Majeau, N., Hogue, R., Leclerc, D., 2007. High avidity binding of engineered papaya mosaic virus virus-like particles to resting spores of *Plasmodiophora Brassicae*. *Journal of Biotechnology* 128, 423-434.

Ozeki, J., Hashimoto, M., Komatsu, K., Maejima, K., Himeno, M., Senshu, H., Kawanishi, T., Kagiwada, S., Yamaji, Y., Namba, S., 2009. The N-terminal Region of the *Plantago asiatica* mosaic virus Coat Protein Is Required for Cell-to-Cell Movement but Is Dispensable for Virion Assembly. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22, 677-685.

Plchova, H., Moravec, T., Hoffmeisterova, H., Folwarczna, J., Cerovska, N., 2011. Expression of Human papillomavirus 16 E7_{ggg} oncoprotein on N- and C-terminus of Potato virus X coat protein in bacterial and plant cells. *Protein Expression and Purification* 77, 146-152.

Savard, C., Guérin, A., Drouin, K., Bolduc, M., Laliberté-Gagné, M.-E., Dumas, M.-C., Majeau, N., Leclerc, D., 2011. Improvement of the Trivalent Inactivated Flu Vaccine Using PapMV Nanoparticles. *PLoS ONE* 6, e21522.

Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M., 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68, 850-858.

Sit, T.L., Abouhaidar, M.G., Holy, S., 1989. Nucleotide Sequence of Papaya Mosaic Virus RNA. *Journal of General Virology* 70, 2325-2331.

Tremblay, M.-H., Majeau, N., Gagné, M.-E.L., Lecours, K., Morin, H., Duvignaud, J.-B., Bolduc, M., Chouinard, N., Paré, C., Gagné, S., Denis, L., 2006. Effect of mutations K97A and E128A on RNA binding and self assembly of papaya mosaic potexvirus coat protein. *FEBS Journal* 273, 14-25.

Verchot-Lubicz, J., 2005. A New Cell-to-Cell Transport Model for Potexviruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18, 283-290.

Verchot-Lubicz, J., Torrance, L., Solovyev, A.G., Morozov, S.Y., Jackson, A.O., Gilmer, D., 2010. Varied Movement Strategies Employed by Triple Gene Block- Encoding Viruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23, 1231-1247.

Verchot-Lubicz, J., Ye, C.-M., Bamunusinghe, D., 2007. Molecular biology of potexviruses: recent advances. *Journal of General Virology* 88, 1643-1655.

Zhang, H., Todderud, E., Stubbs, G., 1993. Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of Papaya Mosaic Virus Coat Protein. *Journal of Molecular Biology* 234, 885-887.

Tables

Table 2-1: PapMV coat protein peptide list.

Coat protein sequence distributed in 27 peptides of 12 amino acids long and overlapping by 4 amino acids on each end. The cysteines were substituted to serines (bold and underlined) as cysteines might otherwise interact with other compounds in the experiments.

Peptide	Sequence
1	MASTPNIAFP AI
2	FPAITQEQMSSI
3	MSSIKVDPTSNL
4	TSNLLPSQEQLK
5	EQLKSVSTLMVA
6	LMVAAKVPAA SV
7	AASVTTVALELV
8	LELVNFSYDNGS
9	DNGSSAYTTVTG
10	TVTGPSSIP EIS
11	PEISLAQLASIV
12	ASIVKASGTS LR
13	TSLRKFSRYFAP
14	YFAPIIWNLR TD
15	LRTDKMAPANWE
16	ANWEASGYKPSA
17	KPSAKFAAFDFE
18	FDFFDGVENPAA
19	NPAAMQPPSGLT
20	SGLTRSPTQEER
21	QEERIANATNKQ
22	TNKQVHLFQAAA
23	QAAAQDNNFASN
24	FASNSAFITKGQ
25	TKGQISGSTPTI
26	TPTIQFLPPPE
27	PPETSTTR

Table 2-2: Antibodies against peptides confirmed to be at the surface of PapMV nanoparticles. Antibodies were produced against peptides that were determined to be at the surface. All the peptides, except peptide 15, confirmed to be at the surface by native ELISA against PapMV nanoparticles. Peptides 13 and 17 are negative controls and did not recognize PapMV nanoparticles.

Peptide number and sequence	Position in PapMV CP	Present at the surface	Recognize by antibody against peptide
1-MASTPNIAFP AI	5 to 16	+	+
13-TSLRKFCRYFAP	101 to 112	-	-
15-LRTDKMAPANWE	117 to 128	+	-
16-ANWEASGYKPSA	125 to 136	+	+
17-KPSAKFAAFDFE	133 to 144	-	-
18-FDFFDGVENPAA	141 to 152	+	+
22-TNKQVHLFQAAA	173 to 184	+	+
24-FASNSAFITKGQ	189 to 200	+	+
26-TPTIQFLPPPE	205 to 215	+	+

Figures

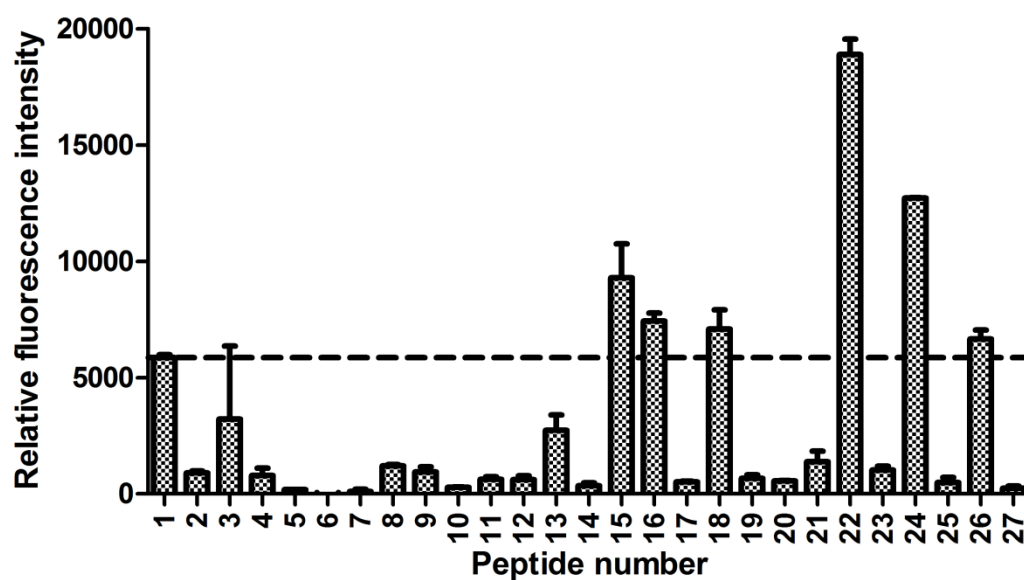


Figure 2-1: Immunodot blot against peptides array derived from the coat protein of PapMV. Targeted peptides of 12 amino acids were revealed using mice sera immunized with PapMV nanoparticles. Seven peptides were targeted and were then revealed to be on the surface of PapMV nanoparticles. The threshold was positioned at the relative fluorescence intensity of peptide 1, as it is known to be surface-exposed in other *Potexvirus* (Baratova et al., 1992a; Ozeki et al., 2009).

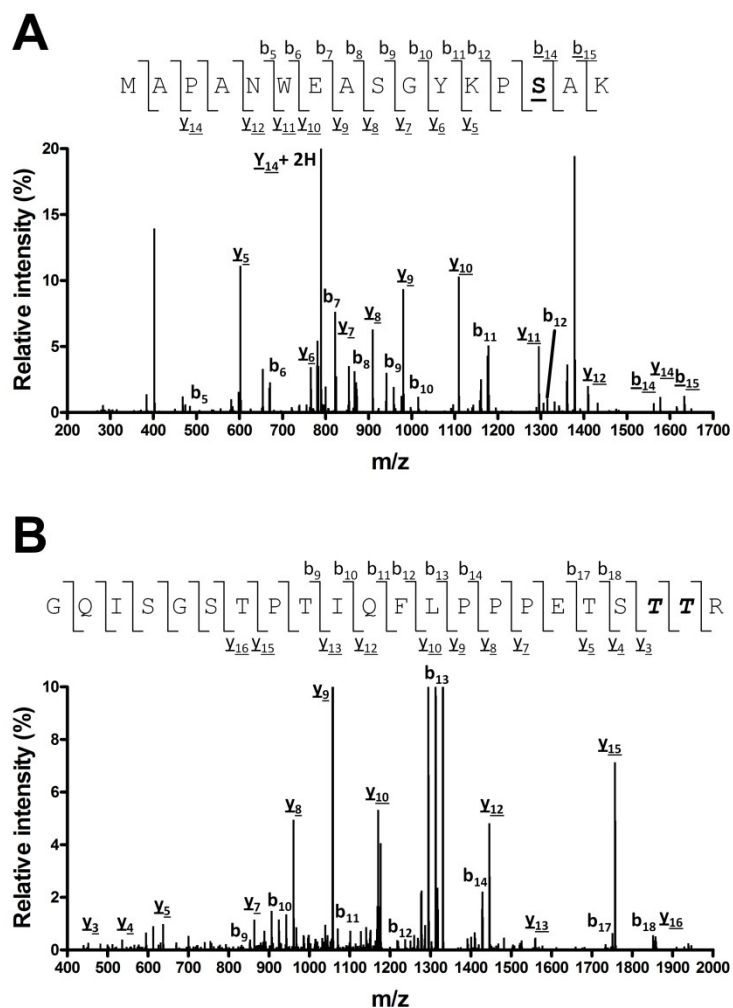


Figure 2-2: MS/MS spectra of digested peptides containing chemical modifications by EDC. Regions that contain modifications are from V16 to K30 (A), from M122 to K137 (B) and from G199 to R221 (C). The underlined products ions contain the EDC modification.

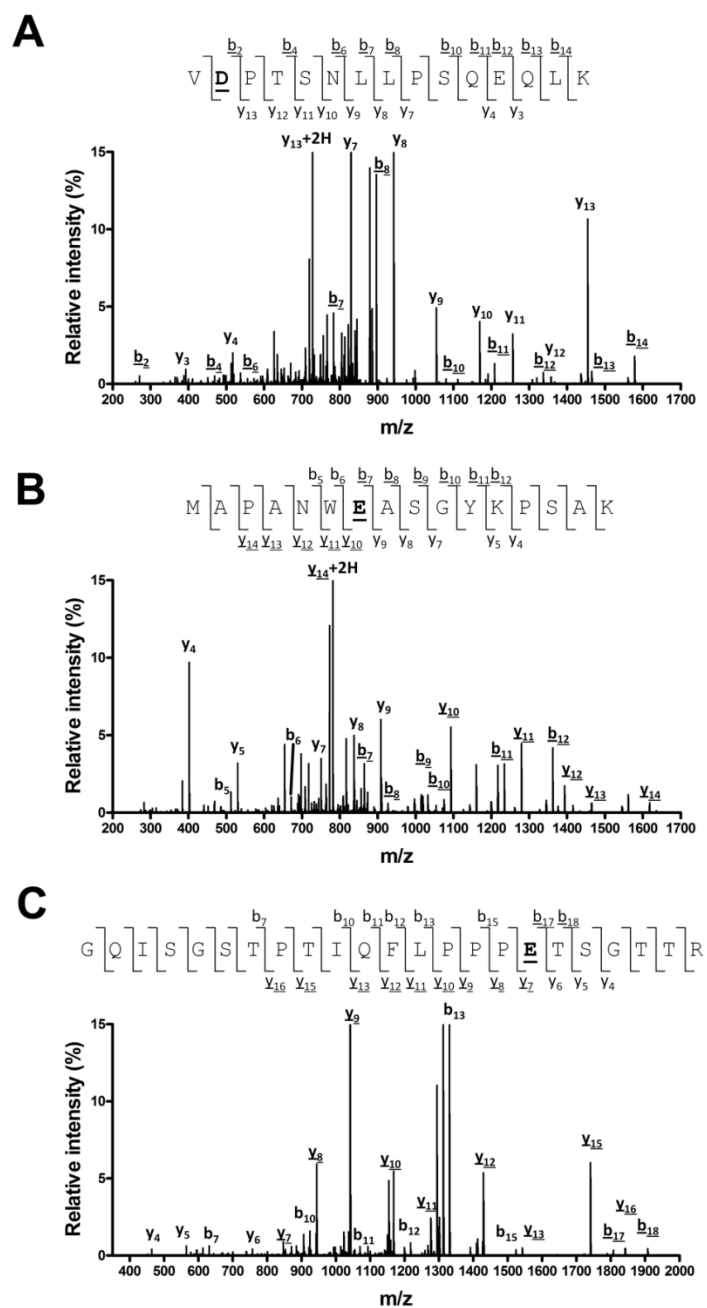


Figure 2-3: MS/MS spectra of digested peptides containing chemical modifications by DEPC. Regions that contain modifications are from M122 to K137 (A) and from G199 to R221 (B). The DEPC modification in B cannot be located precisely and is therefore at either one of the two threonines. The underlined products ions contain the DEPC modification.

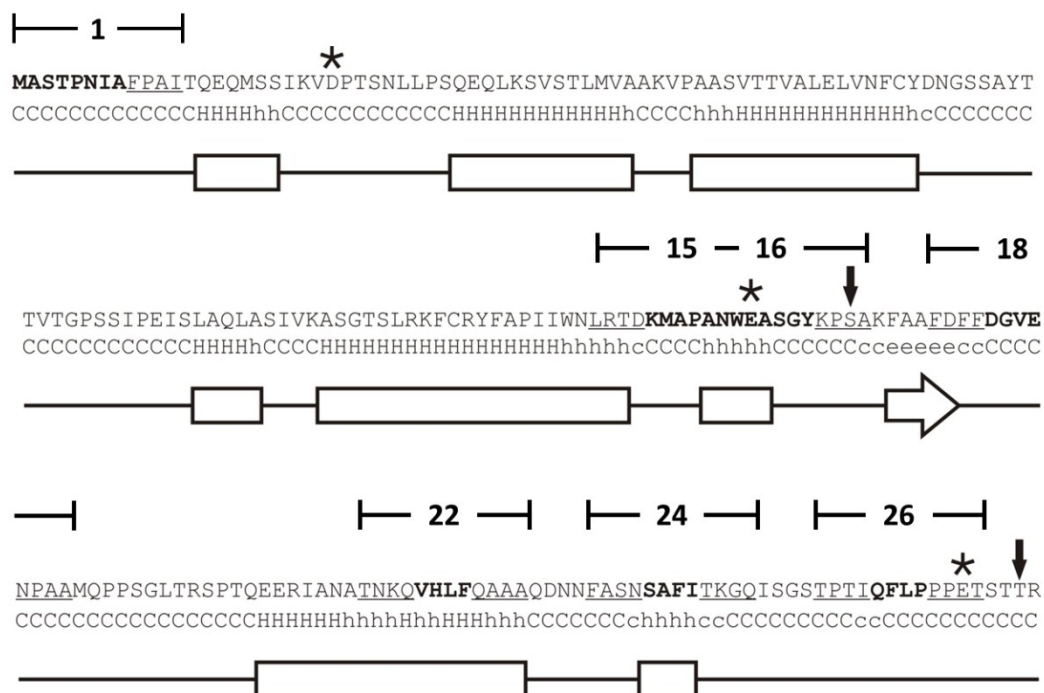


Figure 2-4: Summary of the results of the two techniques and the predicted secondary structure. Arrows and the stars correspond to DEPC and EDC modifications respectively. The accurately targeted peptide parts are in bold and their uncertain overlapping ends are underlined. The predicted secondary structure of PapMV CP reveals that the targeted peptides are in unstructured or dubiously structured parts of the protein (Adapted from Lecours 2006). Predicted β -strand, helix, and coil or loop conformations are indicated by the letters E, H, and C, respectively. Uppercase letters indicate high confidence and lowercase letters indicate lower confidence.

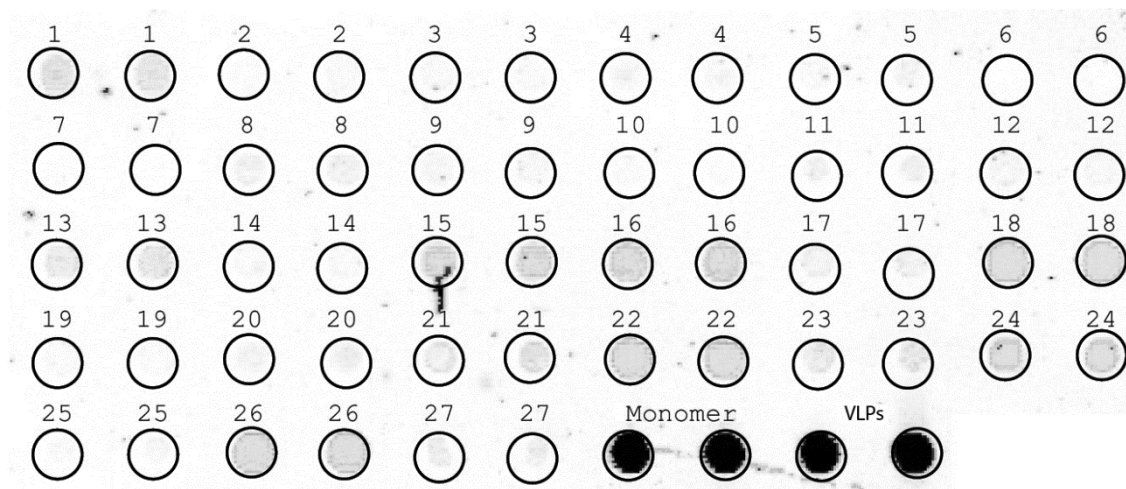
Supplementary figures

Figure S2-1 : Immunodot blot of PapMV nanoparticles.

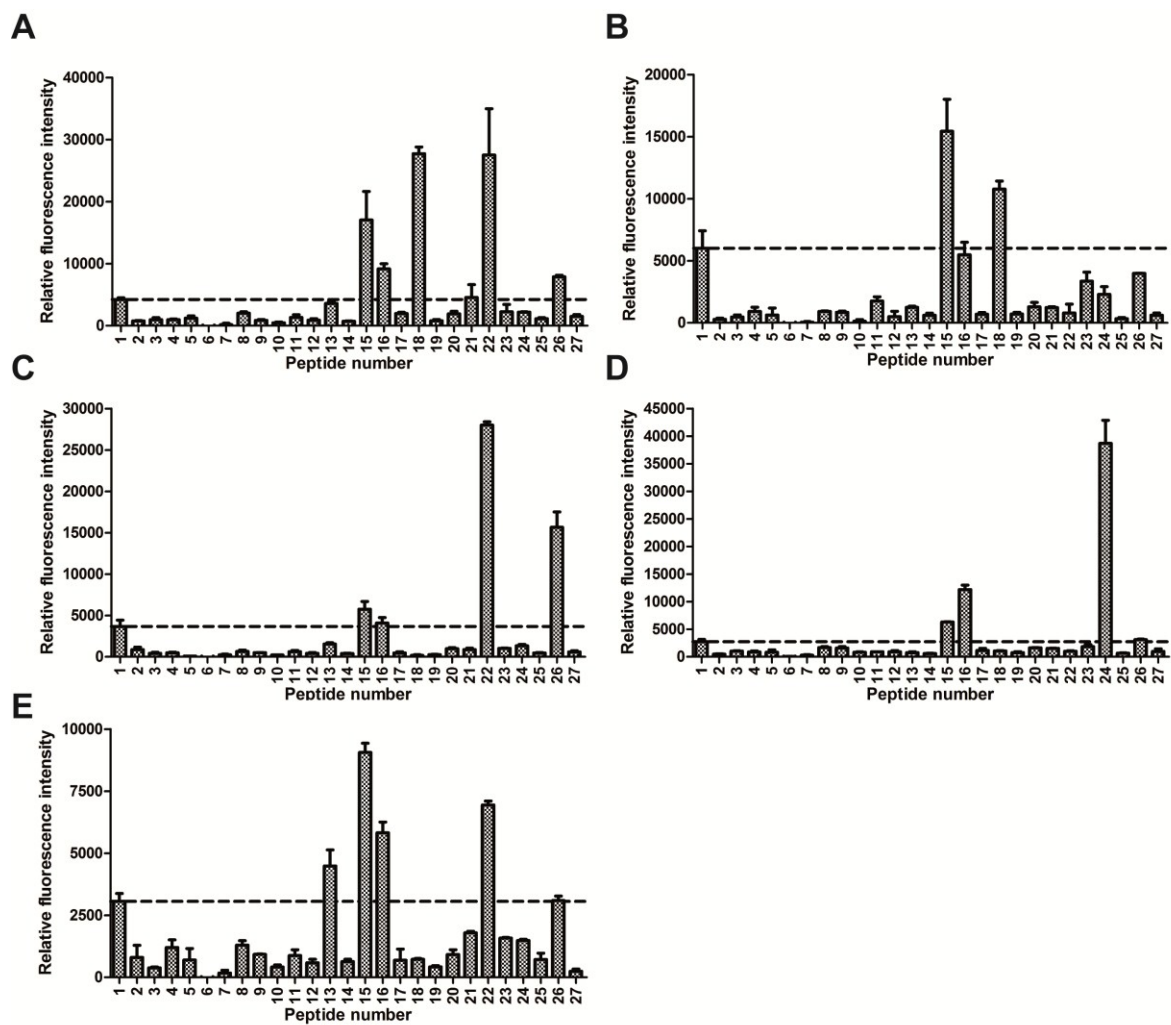


Figure S2-2: Individual immunodot blot of 5 mice immunized with PapMV nanoparticles.

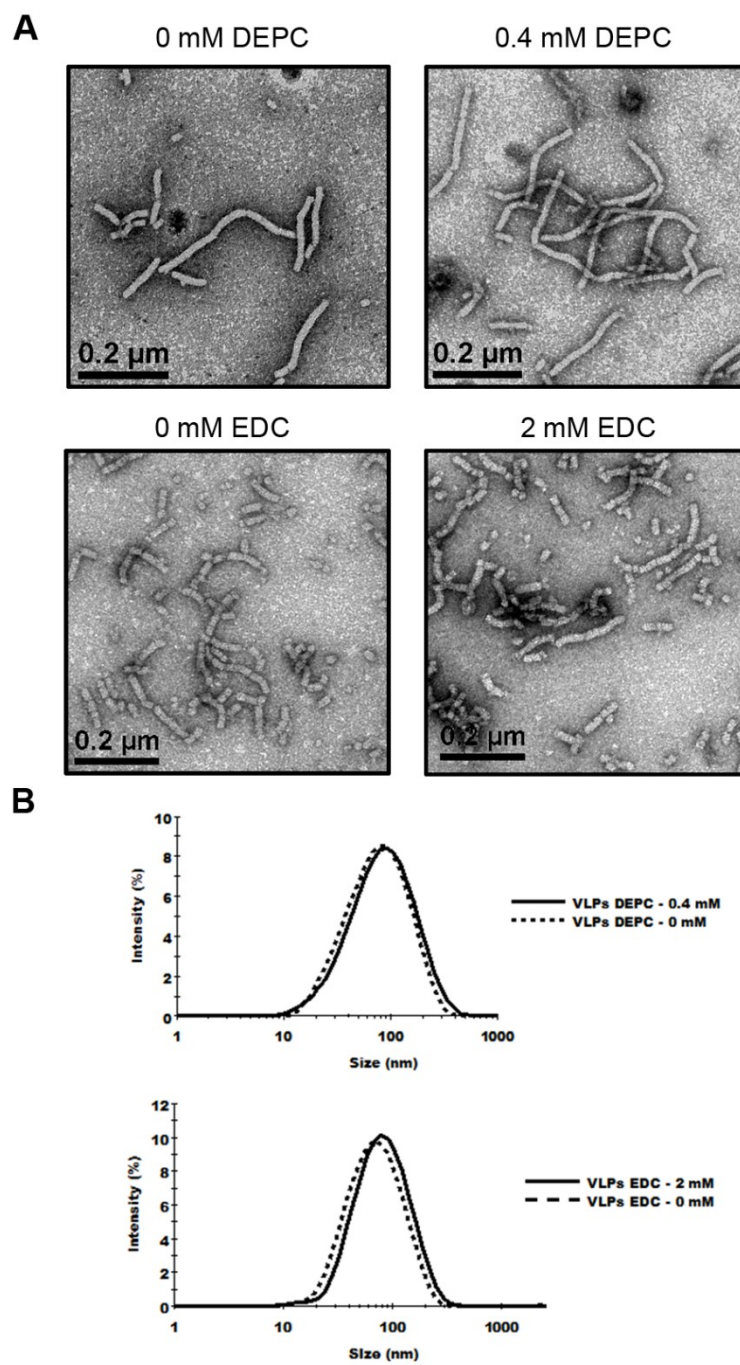


Figure S2-3: Electron microscopy and dynamic light scattering of chemically modified VLPs

Chapitre 3 : Ingénierie du virus de la mosaïque de la papaye par fusion de l'épitope HA11 dans des régions considérées comme exposées à la surface

Résumé

Le virus de la mosaïque de la papaye (PapMV) a été montré comme étant un adjuvant et une plateforme vaccinale efficace par l'amélioration de vaccin grippaux. Jusqu'à maintenant, les fusions sur cette plateforme ont été effectuées à l'extrémité C-terminale de la nucléocapside seulement. Sachant que certains épitopes peuvent interférer avec l'auto-assemblage du PapMV lorsque fusionnés à l'extrémité C-terminale, nous avons évalué d'autres sites de fusion possibles par l'utilisation de l'épitope HA11 de l'Influenza. Deux des six nouveaux sites de fusion testés ont permis de produire des protéines recombinantes pouvant s'auto-assembler en nanoparticules du PapMV. Ces sites se retrouvent après les positions 12 et 187 sur la séquence en acides aminés de la nucléocapside du PapMV. Une immunoprécipitation de ces fusions a permis de démontrer que l'épitope HA11 se retrouvait effectivement à la surface de ces particules virales. L'étude de la stabilité et l'immunogénicité de ces particules recombinantes ont démontré qu'il y avait une forte corrélation entre la stabilité à 37°C (la température corporelle des mammifères) et la capacité à induire une réponse immunitaire contre l'épitope HA11. Cette caractéristique démontre l'importance de la stabilité des nanoparticules afin d'obtenir des réponses immunitaires efficaces en vaccination.

**Engineering of papaya mosaic virus (PapMV) nanoparticles
through fusion of the HA11 peptide to several putative
surface-exposed sites**

Gervais RIOUX, Cindy BABIN, Nathalie MAJEAU and Denis LECLERC

Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Infectious Disease
Research Centre, Laval University, 2705 boul. Laurier, Quebec city, PQ, Canada
G1V 4

Contact: Phone numbers: (418) 654-2705, Fax numbers: (418) 654-2715, E-mail:
Denis.Leclerc@crchul.ulaval.ca

Abstract

Papaya mosaic virus has been shown to be an efficient adjuvant and vaccine platform in the design and improvement of innovative flu vaccines. So far, all fusions based on the PapMV platform have been located at the C-terminus of the PapMV coat protein. Considering that some epitopes might interfere with the self-assembly of PapMV CP when fused at the C-terminus, we evaluated other possible sites of fusion using the influenza HA11 peptide antigen. Two out of the six new fusion sites tested led to the production of recombinant proteins capable of self-assembly into PapMV nanoparticles; the two functional sites are located after amino acids 12 and 187. Immunoprecipitation of each of the successful fusions demonstrated that the HA11 epitope was located at the surface of the nanoparticles. The stability and immunogenicity of the PapMV-HA11 nanoparticles were evaluated, and we could show that there is a direct correlation between the stability of the nanoparticles at 37°C (mammalian body temperature) and the ability of the nanoparticles to trigger an efficient immune response directed towards the HA11 epitope. This strong correlation between nanoparticle stability and immunogenicity in animals suggests that the stability of any nanoparticle harbouring the fusion of a new peptide should be an important criterion in the design of a new vaccine.

Introduction

Papaya mosaic virus (PapMV) is a member of the large family of *Flexiviridae* in the genus Potexvirus. The virus has a flexuous rod shape of 500 nm in length and 14 nm in diameter made of a single viral capsid protein (CP) and the genomic positive sense RNA (Sit et al., 1989). We have previously shown that expression of PapMV CP in bacteria (*E. coli*) leads to production of virus like particles (VLPs) or nanoparticles that can be affinity-purified easily using a 6xH tag (Tremblay et al., 2006). The nanoparticles are non-infectious and are similar in shape and appearance to the wild type virus purified from infected plants (Tremblay et al., 2006).

In the last few years, we have shown that PapMV nanoparticles can be used as a vaccine platform via the fusion of a peptide antigen to the C-terminus of the PapMV CP (Denis et al., 2008; Denis et al., 2007; Lacasse et al., 2008; Leclerc et al., 2007). In fact, the capacity of producing a long-lasting humoral response has been exploited to produce antibodies against a fused HCV immunogenic epitope that was demonstrated to present the peptide in the appropriate conformation (Denis et al., 2007). Also, fusion of the universal M2e peptide antigen derived from influenza M2 protein was showed to trigger a protective humoral response against a lethal influenza infection in mice (Denis et al., 2008). For each of those fusions and others (Morin et al., 2007), self-assembly of the recombinant PapMV CP into nanoparticles ranging from 60 to 100nm in length was shown to be critical to the induction of an efficient humoral response to the fused peptide antigen (Denis et al., 2008; Denis et al., 2007). We have also shown that PapMV nanoparticles can trigger a cytotoxic (CTL) immune response to a fused CTL epitope through loading of MHC class I and the proliferation of CD8⁺ human T cells (Leclerc et al., 2007). In another study, fusion of the p33 CTL epitope derived from the lymphocytic choriomeningitis (LCMV) surface glycoprotein to PapMV CP was sufficient to provide complete protection to a LCMV challenge (Lacasse et al., 2008).

PapMV nanoparticles can also be used as an adjuvant to larger antigens and proteins. We showed an improved IgG2a response to the *Salmonella typhi* porin OmpC

(Acosta-Ramírez et al., 2008), which led to better protection to a challenge with this pathogen. We also demonstrated an improvement in the seasonal flu vaccine using PapMV nanoparticles, with an increased humoral and CTL response to a conserved epitope of the virus leading to protection against a heterosubtypic strain of influenza (Savard et al., 2011). Thus, taken together, these results show that PapMV nanoparticles can be used successfully as a vaccine platform (Denis et al., 2008; Denis et al., 2007; Lacasse et al., 2008; Leclerc et al., 2007) and an adjuvant (Acosta-Ramírez et al., 2008; Savard et al., 2011) to improve the humoral and CTL response to a given peptide or large protein antigen (Lacasse et al., 2008; Leclerc et al., 2007; Savard et al., 2011). Finally, it is also recognized that PapMV nanoparticles are perceived by immune cells as a pathogen-associated pattern (PAMP) (Acosta-Ramírez et al., 2008; Savard et al., 2011).

However, while the PapMV vaccine platform is clearly versatile, and has been shown to tolerate the fusion of several peptides to its C-terminus (Denis et al., 2008; Denis et al., 2007; Lacasse et al., 2008; Leclerc et al., 2007; Morin et al., 2007), it is also possible that the fusion of certain peptides could interfere with the assembly process of the protein into nanoparticles and consequently affect its ability to trigger a proper immune response. It is therefore of interest to search for other sites of fusion in the PapMV CP to improve this vaccine tool. Considering that fusion might disrupt the nearby structure by modifying the surrounding charge and hydrophobicity of the protein, our goal was to find other sites of fusion in the PapMV CP that can tolerate the fusion of a short epitope: the influenza HA11 epitope. In this study, we tested seven new sites of fusion through insertion of HA11 peptide into PapMV CP and evaluated the capacity of those newly engineered VLPs to trigger a proper immune response to the HA11 antigen.

Results

Insertion of the HA11 peptide into 7 putative surface exposed sites of the PapMV-CP

Expression of PapMV-CP in *E. coli* leads to the formation of nanoparticles that have a morphology comparable to the wild type virus (Tremblay et al., 2006). Our objective was to evaluate the capacity of the PapMV platform to tolerate fusion of the HA11 peptide leading to the formation of nanoparticles. The HA11 epitope was chosen for fusion given its small length and the availability of commercial tools to study this epitope. A glycine residue was introduced at the N-terminus of the HA11 epitope to disrupt any secondary structure of the PapMV that could be created by the insertion of the HA11 peptide. Fusions were made at 7 specific sites in the capsid protein taking into consideration the bioinformatic prediction of the secondary structure of PapMV from Lecours (2006). Thereby, our attempts at fusions were made in unstructured regions of the PapMV CP located between highly ordered α -helices and β -sheets of the protein after the residues 12, 33, 84, 122, 134, 162, 187, and finally at the extreme C-terminus of the protein as our control point of fusion (Figure 1). A fusion was made after position 12, but not beyond that point, because of the F13 residue in the PapMV N-terminus that was shown previously to play an important role in the self-assembly of PapMV nanoparticles (Laliberté Gagné et al., 2008).

Recombinant proteins harbouring the fusion at position 33, 84, 122, 134 and 162 led to the production of unstable proteins that could not be studied. However, we were able to isolate large amounts of the recombinant proteins harbouring fusions located after the residues 12 and 187 and, as expected, at the C-terminus (Figure 2AB). As observed by TEM, the three recombinant proteins (PapMV-HA11-12, PapMV-HA11-187 and PapMV-HA11-C) could self-assemble into nanoparticles that were similar in appearance to other recombinant nanoparticles reported previously by our group (Figure 2C) (Denis et al., 2008; Denis et al., 2007; Lacasse et al., 2008; Leclerc et al., 2007; Morin et al., 2007). Dynamic light scattering (DLS) revealed that PapMV-HA11-12 and C yielded shorter VLPs with an average size of 67 nm and 66 nm,

respectively (Figure 2D). PapMV-HA11-187 had a length of 74 nm. Those lengths are in agreement with the approximate length of PapMV nanoparticles observed by electron microscopy (Figure 2C).

The peptide HA11 is exposed at the surface of engineered PapMV nanoparticles

To evaluate the surface availability of the HA11 peptide on the recombinant nanoparticles, we performed an immunoprecipitation using an HA11 monoclonal antibody. PapMV nanoparticles without fusions were efficiently recognized by anti-PapMV mouse serum (Figure 3, lane 1) but not by an HA11 specific monoclonal antibody (Figure 3, lane 2). All the PapMV nanoparticles fused to the HA11 epitope were efficiently immunoprecipitated using the monoclonal HA11-specific monoclonal antibody (Figure 3, lane 3-5) suggesting that the HA11 epitope is available at the surface of the recombinant nanoparticles. This suggests that the HA11 epitope has the right conformation and that it is available for interaction with the monoclonal antibody.

Characterization of biochemical and biophysical properties of recombinant PapMV nanoparticles

Each fusion can potentially influence the structure of the PapMV CP comprising the nanoparticles and therefore affect nanoparticle stability. To evaluate the stability of the nanoparticles, we evaluated their ability to tolerate heat. Any conformational change in the nanoparticles was monitored by examining CD spectra (CD) and DLS at increasing temperatures. The CD spectra taken at a wave length of 208 nm—the major absorption point for the PapMV α -helices—revealed that the fusion to position 187 and at the C-terminus were more sensitive to heat since a change in the secondary structure was measured with temperature exceeding 30°C (see dashed arrow in Figure 4). Interestingly, the point of inflection of the PapMV-HA11-12 nanoparticles was found at approximately 40°C (Figure 4; black arrow), and these nanoparticles appear to be more stable than the other 2 recombinant nanoparticles.

We hypothesized that changes in secondary structure induced by heat will lead to partial denaturation of the PapMV CP, which will consequently expose hydrophobic residues at the surface of the PapMV nanoparticles and lead to aggregation of the VLPs. To validate this hypothesis, we used DLS to measure precisely the aggregation state of the nanoparticles in solution (Figure 5). The three recombinant nanoparticles showed a similar average size of 75, 70 and 80 nm, respectively, for the PapMV-HA11-12, 187 and C-terminus at 20°C. Upon heating, we observed that PapMV-HA11-187 formed large aggregates when the temperature exceeded 25°C. The same phenomenon occurs with the PapMV-HA11-C construct when the temperature exceeded 30°C, and, finally, the PapMV-HA11-12, which was the most stable, showed formation of large aggregates when the temperature exceeded 40°C. These results are consistent with the data obtained with the CD readout and suggest that PapMV-HA11-12 is the most stable VLP of the three recombinant VLPs produced with the HA-11 antigen in fusion.

Correlation between nanoparticle stability and their immunogenicity

The results described above showed that PapMV CP undergoes conformational changes at elevated temperature that lead to partial denaturation and aggregation of the nanoparticles. PapMV-HA11-187 and C started to aggregate at 25 and 30°C, respectively, i.e., temperatures lower than mouse body temperature (36.9°C). Interestingly, PapMV-HA11-12 remains stable at temperatures exceeding this threshold. To determine the impact of particle aggregation on immunogenicity, we injected Balb/C mice, 5 per group, with 100µg PapMV nanoparticles of each construction. We evaluated the humoral response triggered against the HA11 peptide (Figure 6 A-B) and to naked PapMV nanoparticles (Figure 6 C-D). Total IgG titres as well as the IgG2a isotype titres were measured. We found that PapMV-HA11-12 nanoparticles were the most immunogenic, and the only particles able to trigger a very high humoral response against the HA11 peptide (Figure 6 A-B). PaMV-HA11-187 and C were unable to produce a significant immune response to the HA11 peptide. As expected, the PapMV-HA11-12 construct also showed a significantly higher humoral total IgG response against the PapMV vaccine platform than the

PapMV-HA11-187 (Figure 6 C-D). Although total IgG titres of PapMV-HA11-12 and C were similar, PapMV-HA11-12 had a significantly higher IgG2a response against the PapMV platform. PapMV-HA11-C, which was shown to be more stable than PapMV-HA11-187, showed a higher total IgG and IgG2a response to PapMV than PapMV-HA11-187.

Discussion

Using the HA11 peptide as a model antigen, we tested 8 different sites of fusion on the PapMV CP and evaluated the ability of the resulting constructs to self-assemble into nanoparticles. Only three sites were shown to tolerate the fusion—the others leading to unstable proteins. These three sites were the C-terminus, and positions directly after amino acid 187 and amino acid 12, near the N-terminus. These three different recombinant proteins led to the formation of nanoparticles that present HA11 at their surface.

Our laboratory has previously confirmed on several occasions that the C-terminus of the PapMV CP is located at the surface of the VLPs, and leads to the development of a humoral (Denis et al., 2008; Denis et al., 2007) or cytotoxic immune response (Lacasse et al., 2008; Leclerc et al., 2007). Recently, the C-terminus of potato virus X (PVX) CP, the type member of the potexvirus family, was shown to be exposed at the surface of the virus particle (Plchova et al., 2011). Therefore, it is reasonable to expect the CP of other members of the same group to tolerate fusion at this position. We showed that it is possible to fuse a peptide at the N-terminus (after amino acid 12) of the PapMV CP and still get self-assembly into VLPs. Fusion at the N-terminus of the PVX CP was also shown to be tolerated and to lead to the formation of virus particles in a plants (Cruz et al., 1996; Lico et al., 2006; Marusic et al., 2001; Plchova et al., 2011; Uhde et al., 2005). In addition, the N-terminus was predicted to be located at the surface of the potato virus X using tritium planigraphy (Baratova et al., 1992a; Baratova et al., 1992b). Another potexvirus, the bamboo mosaic virus (BaMV) was also showed to support substitution of its native N-terminus by a large peptide of 37 amino acids derived from the VP1 protein of foot and mouth disease virus (FMDV) (Yang et al., 2007). Our results confirm, and are in agreement with those reports, since we showed that the N-terminus of PapMV coat protein is exposed at the surface and can be used efficiently as a site of fusion for an epitope.

We show here for the first time in the potexvirus group, that it is possible to perform a fusion in the interior of the CP after amino acid 187 and maintain the ability to self-

assemble and form VLPs. Nanoparticles harbouring a fusion after amino acid 12, 187 or at the C-terminus were very similar in appearance except that fusions made at the N-terminus and C-terminus appeared to be slightly shorter as compared to other fusions.

Interestingly, nanoparticles harbouring a fusion after amino acid 12 (PapMV-HA11-12) were more stable, and were the only nanoparticles able to trigger an immune response to the HA peptide. It is likely that the CP of the unstable nanoparticles are denatured at 37°C when injected into animals, which leads to the presentation of hydrophobic residues at the surface of the VLPs that in turn lead to non-specific aggregation of degraded material that is less immunogenic. This result revealed the importance of maintaining the highly repetitive and crystalline structure of the nanoparticles after injection into animals to insure an optimal immune response to the target HA peptide. Our results also suggest that measuring the stability of the nanoparticles using the CD spectrum and DLS is a good way of predicting the ability of a newly engineered VLPs to trigger an efficient immune response to the peptide of interest.

To make the link between the experiments presented in this manuscript and previous work published by our group, we have evaluated the stability of the PapMV-M2e-C construct where a long peptide of 28 amino acids derived from the M2 protein of influenza virus as previously described by our group (Denis et al., 2008). We showed that the fusion of the M2e peptide to the PapMV CP C-terminus lead to production of nanoparticles that are unstable at temperature exceeding 30°C (Figure S1-D) which is similar to the PapMV-HA11-C construct that was showed to be not immunogenic (Figure 5). Interestingly, the PapMV-M2e-C nanoparticles were shown to trigger a significant immune response to the M2e peptide and protection to an influenza challenge. It appeared that even if the PapMV-M2e-C nanoparticles are unstable when injected into the animals, they can nevertheless stabilise the M2e peptide and trigger a B-cell response to this peptide. This response was further improved by addition of PapMV nanoparticles because they are more stable and better adjuvant. We concluded that even If the fusion of the M2e peptide to the C-terminus of the

PapMV provided a good immune response, it is likely that this point of fusion is not optimal.

In an attempt to stabilise the PapMV nanoparticles harbouring the M2e peptide, we have produced the constructs PapMV-M2e-12 (Figure S1-A). Unfortunately, even if we could produce and purify the chimeric protein, we were unable to get nanoparticles with this construct. The fusion of this longer peptide inhibited the self-assembly of the protein and lead to production of small aggregates (Figure S1- B).

The difference observed in the immunogenicity between the PapMV-M2e-C (Denis et al., 2008) and the PapMV-HA11-C constructs is intriguing. The difference is possibly related to the presentation of the peptides to the immune cells. One possible explanation is that the HA11 peptide, that is rather hydrophobic, interacts with the surface of the PapMV nanoparticles when fused to the C-terminus of the PapMV platform. Consequently, the peptide is not available for another interaction with the immune cells. To the opposite, the M2e peptide located at the same site could be more available for interacting with immune cells.

In conclusion, our data suggest that it is important to evaluate the stability of future fusions to eliminate from screening programs any VLPs that are unstable, and thus less immunogenic, at body temperature. This process would increase the production and study effectiveness of the PapMV as a vaccine platform. This manuscript also reveals the plasticity of the PapMV vaccine platform since three different sites are now available to perform fusions. It is likely that it will be possible to produce stable PapMV nanoparticles through a fusion after amino acid 187 if the context of the fusion is changed or if peptide other than HA11 that is less detrimental to the stability of the nanoparticles is used.

Materials and methods

Production of PapMV nanoparticles. Oligonucleotides used in PCR for the insertion of the HA11 fusion are described in Table 1. The resulting linear vector harbouring the HA11 coding region fused to the PapMV was digested with *Acc65I* restriction enzyme and ligated using T4 DNA ligase (New England Biolabs). Expression and purification of PapMV nanoparticles fused to the HA11 peptide was performed as described previously (Denis et al., 2008). The production of M2e fusion in PapMV was done as described previously (Denis et al., 2008). Levels of expression for each recombinant nanoparticle were determined by SDS-PAGE. LPS contamination was always less than 50 endotoxin (EU) units/mg of protein of nanoparticles. The size and structure of the nanoparticles were confirmed by observation on a TEM (JEOL -1010, Tokyo, Japan).

SDS-PAGE and electroblotting. Samples were mixed with one-third of the final volume of loading buffer containing 5 % SDS, 30 % glycerol and 0.01 % bromophenol blue. SDS-PAGE was performed as described elsewhere (Lecours et al., 2006).

Immunoprecipitation and western blotting. One microgram of each nanoparticle was immunoprecipitated using monoclonal antibody against the HA11 epitope (Cedarlane, cat# CLH104AP, Burlington, Canada) and mice sera against PapMV at a dilution of 1:150 in TBS containing 1 µg/ml BSA and incubated at 4°C on a shaking table for 1 hour. Sheep anti-mouse IgG secondary antibodies coupled with magnetic dynabeads (DynaL AS, cat# 112.01D, Invitrogen) were used to link primary antibodies. Western blotting was performed by SDS-PAGE and a semi-dry transfer on nitrocellulose membrane. Membrane were blocked with 5 % milk and samples were revealed with anti-PapMV rabbit antibodies and anti-rabbit antibodies coupled with alkaline phosphatase diluted 1:10 000 in the blocking buffer.

Dynamic light scattering. The size of nanoparticles was recorded with a ZetaSizer Nano ZS (Malvern, Worcestershire, United Kingdom) at a temperature of 10°C at a concentration of 0.1 mg/ml diluted in PBS 1X. The variation in nanoparticle size

induced by temperature variations was measured according to the same experimental conditions.

Circular dichroism spectroscopy. CD spectra were recorded on a Jasco J-815 (Easton, MD, USA) at temperatures ranging from 15°C to 50°C with 1°C steps. A concentration of 0.1mg/ml of each protein was read in a 1mm light path quartz cell at a wavelength of 208nm. Samples were heated to the target temperature, and held at that temperature for 5 seconds before measuring the ellipticity as calculated elsewhere (Lecours et al., 2006).

Immunization. Five 6- to 8-week-old BALB/c mice were injected subcutaneously with: (i) 100 µg of PapMV nanoparticles; (ii) 100 µg of PapMV nanoparticles and 5 µg of HA11 peptide; or (iii) 100 µg of PapMV-HA11 nanoparticles of each fusion. A booster shot was given 2 weeks after the first injection and blood samples were obtained 2 weeks after the boost.

ELISA quantification. ELISA was performed as described elsewhere (Savard et al., 2011) using GST-HA11 at 1 µg/ml and PapMV-CP nanoparticles at 0.1 µg/ml as bait. GST-HA11 was produced through a C-terminal fusion of the HA11 antigen on the PGEX-2T vector (GE Healthcare) and affinity purified according to standard procedures. Serial dilutions of mice sera were done by two-fold steps starting at 1:50. Results are expressed as an antibody endpoint titer greater than three-fold OD of the background value consisting of preimmune sera. Data were analyzed with a parametric ANOVA test. Tukey's post tests were used to compare differences in antibody titres among groups of mice. Values of **p < 0.01 and ***p < 0.0001 were considered statistically significant. Statistical analyses were performed with GraphPad PRISM 5.01.

Ethics Statement. All the work with animals has been done with Institution approved ethics protocol by the 'Comité de Protection des Animaux - CHUQ (CPA-CHUQ). The approval of this project is found under the authorization number 2010148-1.

Acknowledgments

We would like to thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Canadian Institutes Health Research (CIHR) for funding this research program and Helen Rothnie for editing and critical reading of this manuscript.

References

- Acosta-Ramírez, E., Pérez-Flores, R., Majeau, N., Pastelin-Palacios, R., Gil-Cruz, C., Ramírez-Saldaña, M., Manjarrez-Orduño, N., Cervantes-Barragán, L., Santos-Argumedo, L., Flores-Romo, L., Becker, I., Isibasi, A., Leclerc, D., López-Macias, C., 2008. Translating innate response into long-lasting antibody response by the intrinsic antigen-adjuvant properties of papaya mosaic virus. *Immunology* 124, 186-197.
- Baratova, L.A., Grebenschikov, N.I., Dobrov, E.N., Gedrovich, A.V., Kashirin, I.A., Shishkov, A.V., Efimov, A.V., Järvekülg, L., Radavsky, Y.L., Saarma, M., 1992a. The organization of potato virus X coat proteins in virus particles studied by tritium planigraphy and model building. *Virology* 188, 175-180.
- Baratova, L.A., Grebenschikov, N.I., Shishkov, A.V., Kashirin, I.A., Radavsky, J.L., Järvekülg, L., Saarma, M., 1992b. The topography of the surface of potato virus X: tritium planigraphy and immunological analysis. *Journal of General Virology* 73, 229-235.
- Cruz, S.S., Chapman, S., Roberts, A.G., Roberts, I.M., Prior, D.A., Oparka, K.J., 1996. Assembly and movement of a plant virus carrying a green fluorescent protein overcoat. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 6286-6290.
- Denis, J., Acosta-Ramírez, E., Zhao, Y., Hamelin, M.-E., Koukavica, I., Baz, M., Abed, Y., Savard, C., Pare, C., Lopez Macias, C., Boivin, G., Leclerc, D., 2008. Development of a universal influenza A vaccine based on the M2e peptide fused to the papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform. *Vaccine* 26, 3395-3403.
- Denis, J., Majeau, N., Acosta-Ramírez, E., Savard, C., Bedard, M.-C., Simard, S., Lecours, K., Bolduc, M., Pare, C., Willems, B., Shoukry, N., Tessier, P., Lacasse, P., Lamarre, A., Lapointe, R., Lopez Macias, C., Leclerc, D., 2007. Immunogenicity of papaya mosaic virus-like particles fused to a hepatitis C virus epitope: Evidence for the critical function of multimerization. *Virology* 363, 59-68.
- Lacasse, P., Denis, J., Lapointe, R., Leclerc, D., Lamarre, A., 2008. Novel Plant Virus-Based Vaccine Induces Protective Cytotoxic T-Lymphocyte-Mediated Antiviral Immunity through Dendritic Cell Maturation. *J. Virol.* 82, 785-794.
- Laliberté Gagné, M.E., Lecours, K., Gagné, S., Leclerc, D., 2008. The F13 residue is critical for interaction among the coat protein subunits of papaya mosaic virus. *FEBS Journal* 275, 1474-1484.
- Leclerc, D., Beauseigle, D., Denis, J., Morin, H., Pare, C., Lamarre, A., Lapointe, R., 2007. Proteasome-Independent Major Histocompatibility Complex Class I Cross-Presentation Mediated by Papaya Mosaic Virus-Like Particles Leads to Expansion of Specific Human T Cells. *J. Virol.* 81, 1319-1326.

Lecours, K., Tremblay, M.-H., Gagné, M.-E.L., Gagné, S.M., Leclerc, D., 2006. Purification and biochemical characterization of a monomeric form of papaya mosaic potexvirus coat protein. *Protein Expression and Purification* 47, 273-280.

Lico, C., Capuano, F., Renzone, G., Donini, M., Marusic, C., Scalon, A., Benvenuto, E., Baschieri, S., 2006. Peptide display on Potato virus X: molecular features of the coat protein-fused peptide affecting cell-to-cell and phloem movement of chimeric virus particles. *Journal of General Virology* 87, 3103-3112.

Marusic, C., Rizza, P., Lattanzi, L., Mancini, C., Spada, M., Belardelli, F., Benvenuto, E., Capone, I., 2001. Chimeric Plant Virus Particles as Immunogens for Inducing Murine and Human Immune Responses against Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Virol.* 75, 8434-8439.

Morin, H., Tremblay, M.-H., Plante, É., Paré, C., Majeau, N., Hogue, R., Leclerc, D., 2007. High avidity binding of engineered papaya mosaic virus virus-like particles to resting spores of *Plasmodiophora Brassicae*. *Journal of Biotechnology* 128, 423-434.

Plchova, H., Moravec, T., Hoffmeisterova, H., Folwarczna, J., Cerovska, N., 2011. Expression of Human papillomavirus 16 E7_{ggg} oncoprotein on N- and C-terminus of Potato virus X coat protein in bacterial and plant cells. *Protein Expression and Purification* 77, 146-152.

Savard, C., Guérin, A., Drouin, K., Bolduc, M., Laliberté-Gagné, M.-E., Dumas, M.-C., Majeau, N., Leclerc, D., 2011. Improvement of the Trivalent Inactivated Flu Vaccine Using PapMV Nanoparticles. *PLoS ONE* 6, e21522.

Sit, T.L., Abouhaidar, M.G., Holy, S., 1989. Nucleotide Sequence of Papaya Mosaic Virus RNA. *Journal of General Virology* 70, 2325-2331.

Tremblay, M.-H., Majeau, N., Gagné, M.-E.L., Lecours, K., Morin, H., Duvignaud, J.-B., Bolduc, M., Chouinard, N., Paré, C., Gagné, S., Denis, L., 2006. Effect of mutations K97A and E128A on RNA binding and self assembly of papaya mosaic potexvirus coat protein. *FEBS Journal* 273, 14-25.

Uhde, K., Fischer, R., Commandeur, U., 2005. Expression of multiple foreign epitopes presented as synthetic antigens on the surface of Potato virus X particles. *Archives of Virology* 150, 327-340.

Yang, C.-D., Liao, J.-T., Lai, C.-Y., Jong, M.-H., Liang, C.-M., Lin, Y.-L., Lin, N.-S., Hsu, Y.-H., Liang, S.-M., 2007. Induction of protective immunity in swine by recombinant bamboo mosaic virus expressing foot-and-mouth disease virus epitopes. *BMC Biotechnology* 7, 62.

Table

Table 3-1. Forward and reverse oligonucleotides used to produce the seven PapMV-HA11 recombinant proteins.

The underlined sequences indicate the *Acc65I* restriction site.

Name	Oligonucleotide sequence
HA12	
Forward	5' -ACGT <u>GGTACCC</u> GTACGACGTTCCGGATTACGCGTTC CCCCGCCATC ACCCAGGAAC-3'
Reverse	5' -ACGT <u>GGTACCC</u> GGCTATGTTGGGTGTGGATGC-3'
HA33	
Forward	5' -ACGT <u>GGTACCC</u> GTACGACGTTCCGGATTACGCGCCCTCCCAAGAGCAGTTAAAG-3'
Reverse	5' -ACGT <u>GGTACCC</u> CAGAAGATTGGACGTTGGATC-3'
HA84	
Forward	5' -ACGT <u>GGTACCC</u> GTACGACGTTCCGGATTACGCGCCGGAGATATCACTGGCACAA-3'
Reverse	5' -ACGT <u>GGTACCC</u> TATTGATGATGGGCCAGTCAC-3'
HA122	
Forward	5' -ACGT <u>GGTACCC</u> GTACGACGTTCCGGATTACGCGCCTGCCAATTGGGAGGCCTCA-3'
Reverse	5' -ACGT <u>GGTACCC</u> CAGCCATTTTGTCCGTCCTCAG-3'
HA134	
Forward	5' -ACGT <u>GGTACCC</u> GTACGACGTTCCGGATTACGCGAGCGCCAAATTTGCCGCGTTC-3'
Reverse	5' -ACGT <u>GGTACCC</u> CTGGCTTGTATCCTGAGGCCTC-3'
HA162	
Forward	5' -ACGT <u>GGTACCC</u> GTACGACGTTCCGGATTACGCGCCGACCCAGGAAGAGCGGATT-3'
Reverse	5' -ACGT <u>GGTACCC</u> CGACCTGGTTAGTCCCGAAGG-3'
HA187	
Forward	5' -ACGT <u>GGTACCC</u> GTACGACGTTCCGGATTACGCGAACAAC TTTGCCAGCAACTCC -3'
Reverse	5' -ACGT <u>GGTACCC</u> GTCTGTGCCGCGGCTTGGAA-3'
HAC	
Forward	5' -ACGT <u>GGTACCC</u> GTACGACGTTCCGGATTACGCGACGCGTCACCATCACCATCAC-3'
Reverse	5' -ACGT <u>GGTACCC</u> ACTAGTTTCGGGGGGTGGAAAG-3'

Figures

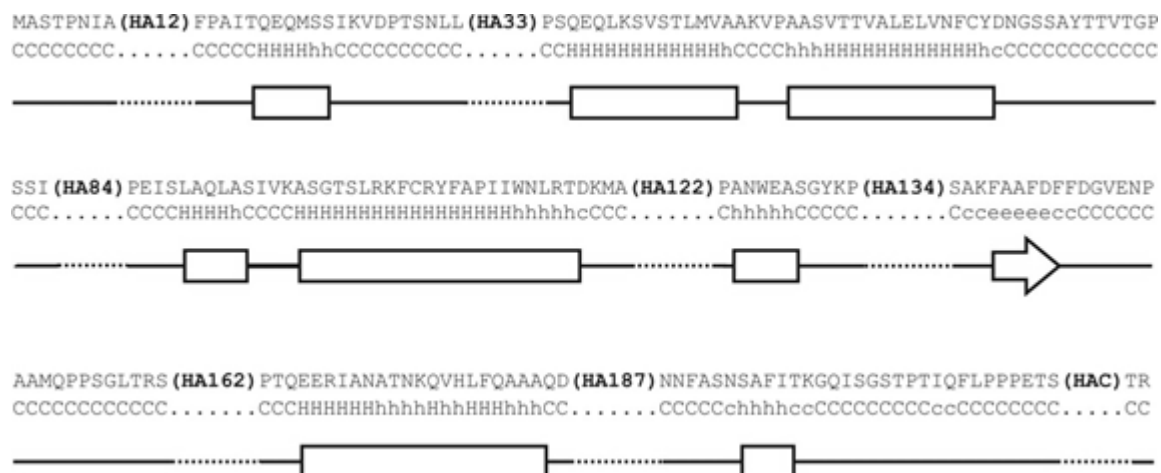


Figure 3-1. PapMV amino acid sequence and structure.

PapMV capsid protein amino acid sequence with each site of fusion and a bioinformatic secondary structure prediction (adapted from Lecours 2006).

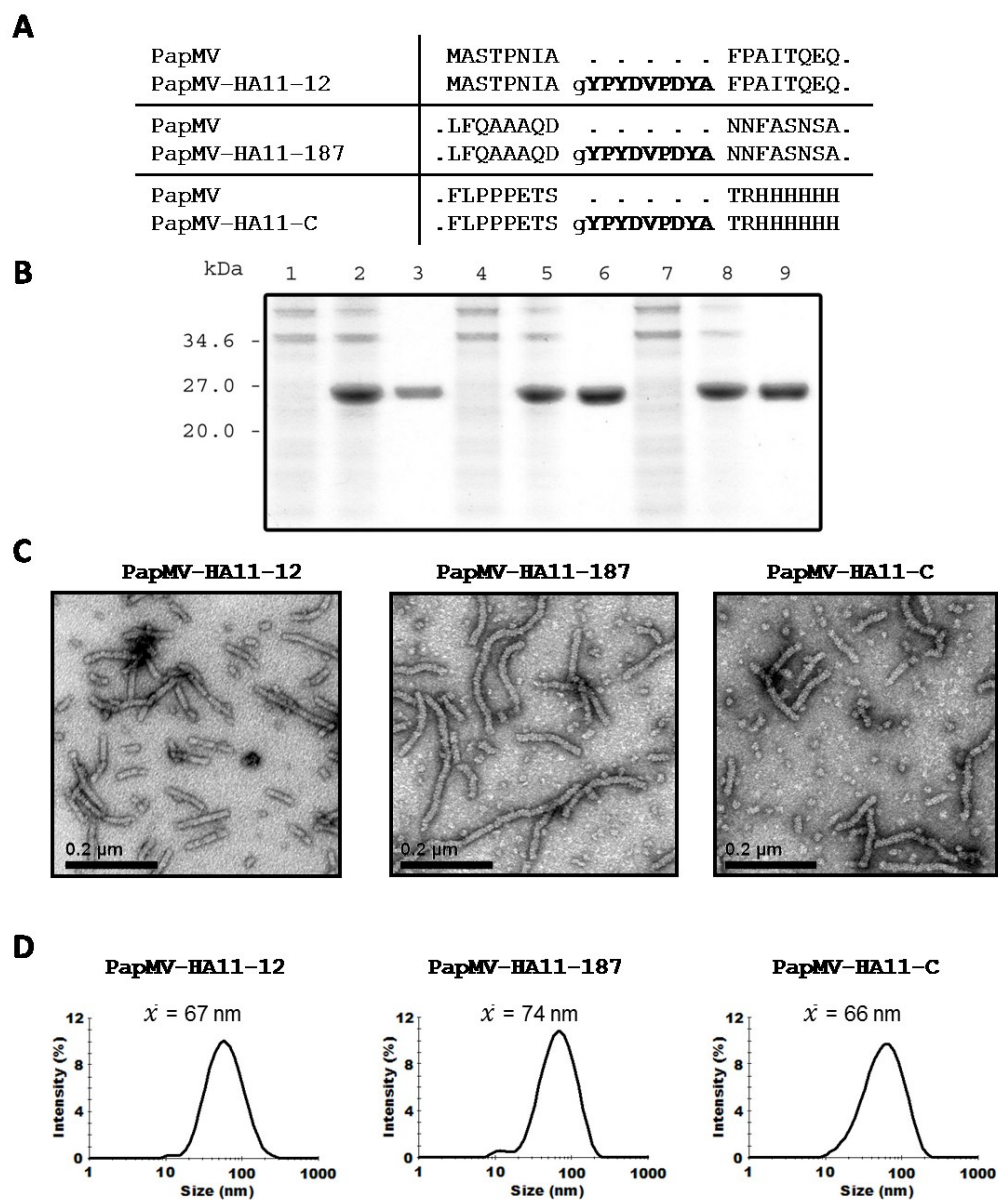


Figure 3-2. PapMV-HA11 recombinant proteins.

The three PapMV-HA11 fusions produced have characteristics similar to those of PapMV nanoparticles. (A) The sequence of the PapMV-CP-HA11 proteins produced. (B) Bacterial lysate of the culture before induction (first lane), after induction with IPTG (second lane), and after successful purification with nickel beads, third lane, of PapMV-CP-HA11-12 (lane 1-3), 187 (lane 4-6) and C (lane 7-9). (C) Transmission electron microscope images of each HA11 fusion. (D) Size of VLPs recorded by dynamic light scattering (DLS).

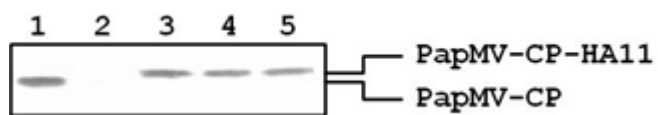


Figure 3-3. Immunoprecipitation and western blot of PapMV with or without HA11 fusion. PapMV was immunoprecipitated with anti-PapMV mouse serum (lane 1) and with anti-HA11 monoclonal antibody (lane 2). PapMV-HA11-12, 187 and C are immunoprecipitated by anti-HA11 monoclonal antibody (lane 3-5) confirming that the HA11 peptide is at the surface.

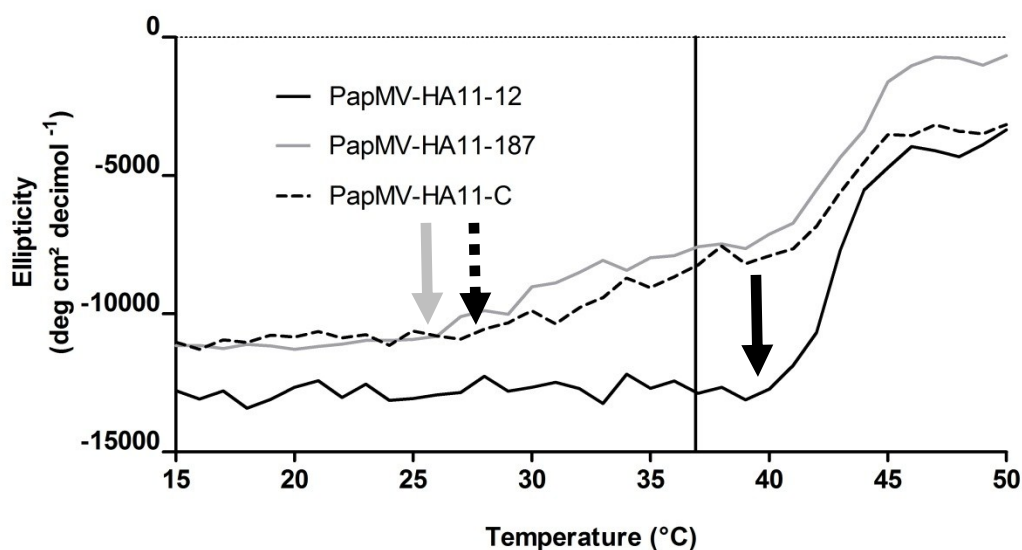


Figure 3-4. Structural changes in PapMVCP in the different recombinant nanoparticles induced by an increase in temperature.

Each of the recombinant nanoparticles (PapMV-HA11-12, PapMV-HA11-187 and PapMV-HA11-C) at a concentration of 0.1mg/ml were heated in steps of 1°C and secondary structure changes of the protein was monitored by circular dichroism. The read-out was performed at a wave length of 208nm. The arrows show the point of inflection for each of the nanoparticles. The black bar represents the body temperature of mice (36.9°C).

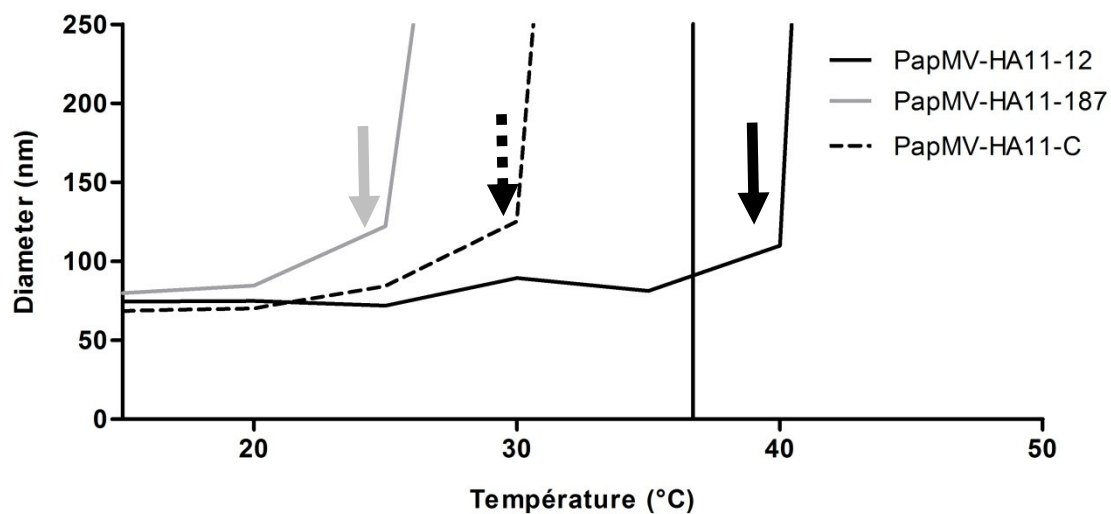


Figure 3-5. Aggregation of recombinant nanoparticles upon heating.

Each of the recombinant nanoparticles at a concentration of 0.1mg/ml were heated by steps of 5°C and DLS spectra of the samples was measured. The approximate size of the particles measured indicates the level of aggregation of the samples. The arrows show the point of inflection for each of the nanoparticles. The black bar represents the body temperature of mice (36.9°C).

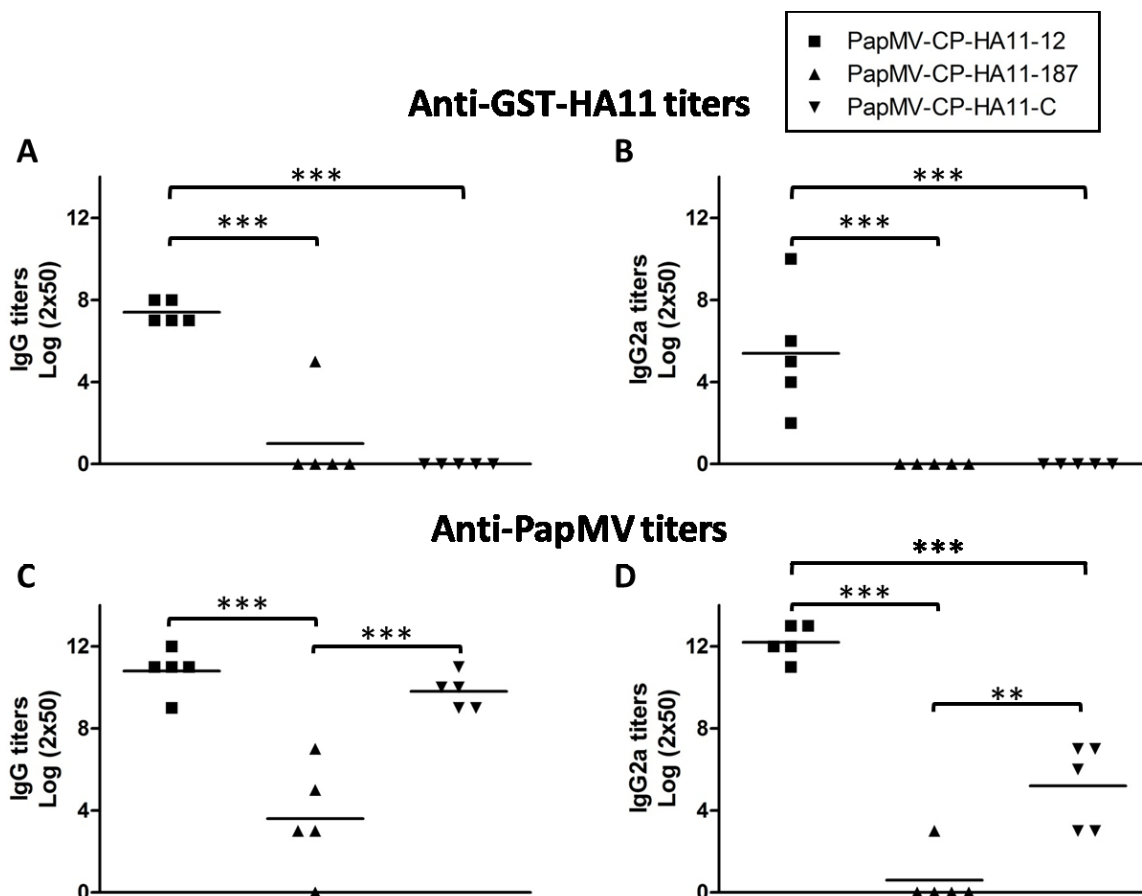


Figure 3-6. Stable nanoparticles are more immunogenic in animals.

Balb/C mice (5 per groups) were immunized twice with a 14-day interval with 100 μ g s.c. of PapMV-HA11-12, PapMV-HA11-187 or PapMV-HA11-C, respectively. The total IgG (A) or the IgG2a (B) humoral response directed to the HA11 peptide was measured by ELISA. Also, the total IgG (C) and IgG2a (D) directed to the PapMV CP was measured by ELISA. *** $P < 0.0001$ ** $P < 0.01$

Supplementary figures

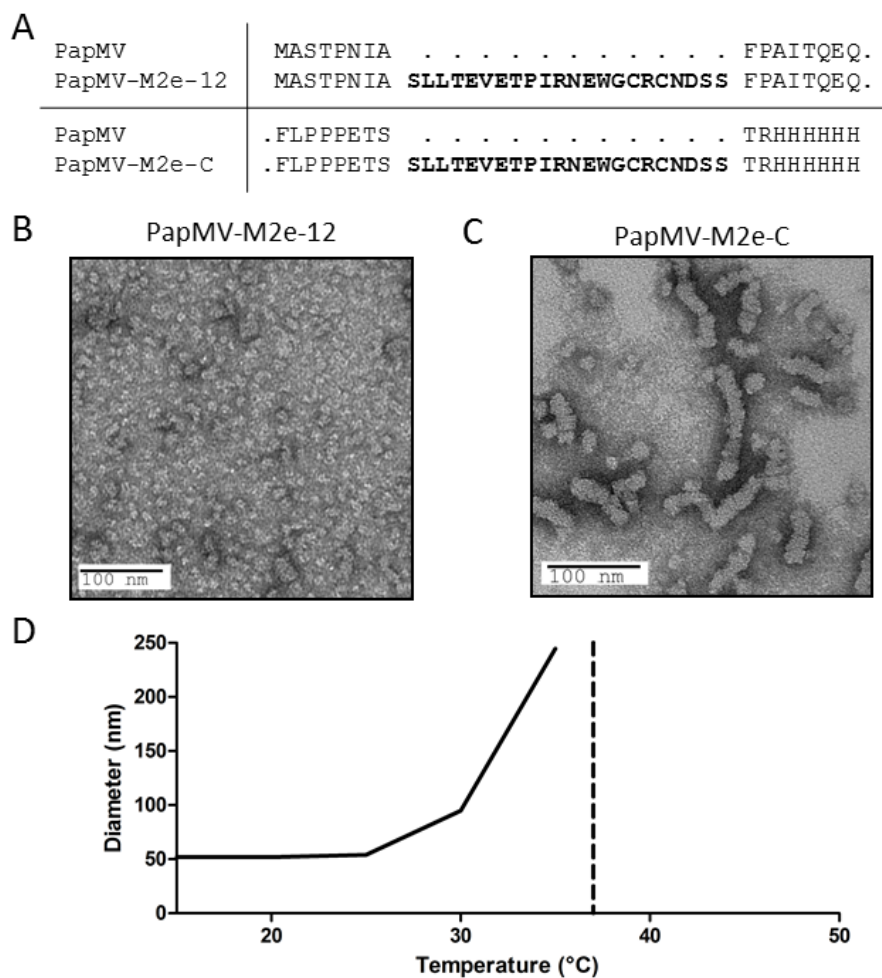


Figure S3-1. Stability of PapMV-M2e-C nanoparticles.

(A) Schematic representation of the fusion made on the PapMV CP with the M2e peptide. (B) Electron microscopy micrographs of PapMV-M2e-12 and (C) PapMV-M2e-C. (D) Aggregation of the PapMV-M2e-C nanoparticles upon heating as measured using dynamic light scattering (DLS). The dotted line represents the body temperature of mice.

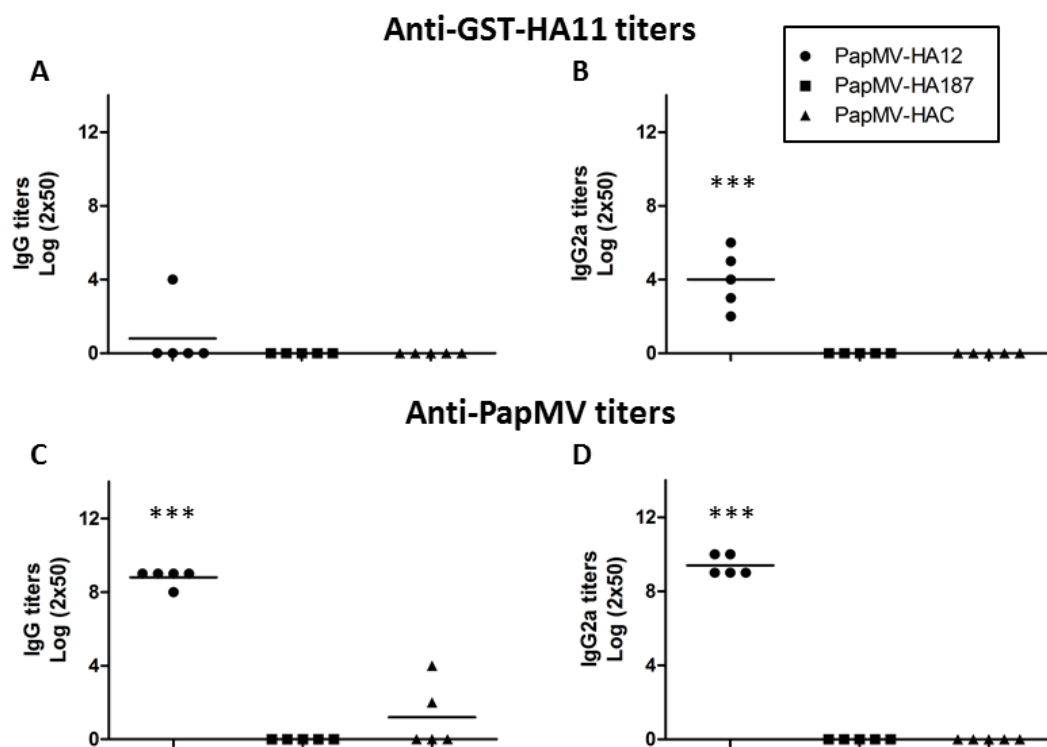


Figure S3-2. Immune response after one immunization.

Balb/C mice (5 per groups) were immunized once with 100 μ g s.c. of PapMV-HA11-12, PapMV-HA11-187 or PapMV-HA11-C, respectively. Sera were harvested 14 days following the first immunization. The total IgG (A) or the IgG2a (B) humoral response directed to the HA11 peptide was measured by ELISA. Also, the total IgG (C) and IgG2a (D) directed to the PapMV CP was measured by ELISA. *** $P < 0.0001$

Chapitre 4 : Discussion

1. La surface du virus de la mosaïque de la papaye

La surface du virus de la mosaïque de la papaye a été étudiée avec deux approches méthodologiques distinctes : immunologique et chimique. La approche immunologique a permis de mettre en évidence les peptides pouvant induire la production d'anticorps contre le PapMV. Cette technique comporte un certain nombre de limitations. Par exemple, le répertoire de la souris est limité par la reconnaissance des épitopes envers lequel elle peut induire une réponse immunitaire. De plus, les épitopes reconnus par les anticorps sont majoritairement de type conformationnel et ne sont pas aptes à reconnaître efficacement des peptides linéaires comme ceux utilisés sur les micropuces. L'avantage de la technique dite chimique est qu'elle permet de cibler les peptides sans biais et de façon directe. Cependant, cette technique est beaucoup moins sensible et révèle seulement les régions ayant subi des modifications majeures. En effet, le spectromètre de masse ne permet pas de détecter des composés modifiés à faibles pourcentages. Une nouvelle technique de fragmentation de peptides permettant de détecter plus efficacement les modifications chimiques d'une surface de protéine, l'«Electron-transfer dissociation», pourrait être utilisée pour vérifier les résultats obtenus avec une plus grande précision (Vasicek et al., 2012).

Sept régions distinctes ont été déterminées, incluant les extrémités N- et C-terminales. Les deux techniques ont permis de cibler les extrémités N- et C-terminales, ainsi que la région 117 à 136. Ces régions peuvent donc être considérées comme étant les régions majeures de la surface du PapMV. Les régions 141-152, 173-184, 189-200 et 205-215 ont été révélées par la technique immunologique seulement et suggère qu'elles sont exposées à la surface des particules.

Des mutations ciblées dans les régions de surface pourraient mettre en évidence certains rôles de la capsidie du PapMV dans son utilisation comme adjuvant. En effet, il est possible que le système immunitaire reconnaisse la surface des particules, que

cette reconnaissance soit importante pour l'effet adjuvant du PapMV. Il est ainsi possible que le PapMV soit reconnu par des récepteurs exprimés sur des cellules de l'immunité, et que cet attachement engendre une activation du système immunitaire. En fait, des expériences récentes ont montré que des résidus de surface du PapMV ont une implication majeure dans un phénomène d'agrégation. Cette agrégation implique que des particules du PapMV se lient entre-elles sans pour autant être dénaturées. Des mutations cibles dans la région 117 à 136 ont permis de diminuer cet effet d'agrégation des particules du PapMV lorsqu'elles sont exposées à la température corporelle des mammifères. La perte de cette prédisposition pour l'agrégation a diminué les capacités du PapMV à induire une forte réponse immunitaire. De plus, il a été montré que la capture des particules virales par le système immunitaire est nettement réduite lorsque des mutations cibles sont introduites dans cette région. Ces travaux sont présentement en cours et feront donc l'objet d'expériences plus approfondies.

Enfin, considérant les différents rôles de la capsidie dans le cycle viral (Callaway et al., 2001; Verchot-Lubicz, 2005), il serait intéressant d'évaluer l'implication de ces régions de surface dans l'inféctivité des virus sauvages. En effet, la capsidie virale a été décrite à plusieurs reprises à propos de son rôle dans l'inféctivité et dans la propagation du virus à l'intérieur de la plante. La capsidie a été décrite comme pouvant interagir avec les protéines de mouvement chez les *Potexvirus* et participant à l'inféction des cellules adjacentes (Callaway et al., 2001; Verchot-Lubicz, 2005; Verchot-Lubicz et al., 2010; Verchot-Lubicz et al., 2007). Des mutations ciblées pourraient encore une fois mettre en lumière certains rôles de la capsidie virale dans l'inféction des plantes.

2. La plateforme vaccinale du virus de la mosaïque de la papaye

Le virus de la mosaïque de la papaye a été utilisé comme plateforme vaccinale en fusionnant un épitope du virus de l'Influenza, HA11, afin d'évaluer ses capacités à accepter des fusions à différents sites. Des fusions ont été possibles aux extrémités N- et C-terminales et dans la région suivant l'acide aminé 187. Une immunoprécipitation

et un immunobuvardage ont permis de confirmer que les épitopes fusionnés étaient exposés en surface des particules virales produites *in vitro*. Cependant, la fusion du peptide HA11 à ces sites de fusions avait une influence sur la stabilité des particules. En fait, les fusions à l'extrémité C-terminale et en position 187 ont déstabilisé les particules qui n'étaient plus stables à la température corporelle des mammifères. D'un autre côté, la fusion à l'extrémité N-terminale n'a pas eu d'influences majeures sur la stabilité. Cette perte de stabilité a eu un effet négatif sur la réponse immunitaire contre le peptide fusionné et donc sur les capacités de plateforme du virus de la mosaïque de la papaye.

Devant cette nouvelle importance de la stabilité des particules, les résultats de précédentes études ont été réexaminés. Ainsi, l'évaluation de la stabilité de la fusion M2e de Denis et al. (2008) a permis de conclure que la perte de stabilité de cette fusion pouvait expliquer la nécessité d'utiliser un adjuvant. En effet, un adjuvant était essentiel afin d'obtenir une réponse immunitaire forte qui pouvait induire une protection contre une infection létale au virus de l'Influenza (Denis et al., 2008). De plus, une fusion de l'épitope M2e à l'extrémité N-terminale n'a malheureusement pas permis de produire des particules virales. D'un autre côté, il est important de noter que la fusion en position 12 est très près du résidu F13, qui est d'une importance capitale dans l'assemblage des particules virales (Laliberté Gagné et al., 2008). Une fusion plus près de l'extrémité N-terminale permettrait possiblement de diminuer l'effet d'une fusion sur l'assemblage des particules virales. De plus, la fusion d'épitopes à l'intérieur de régions qui ont une similarité dans leurs séquences en acides aminés pourrait permettre de diminuer l'impact de cette fusion sur la protéine.

L'étude présentée dans ce mémoire fait état de la capacité de fusion d'un seul et unique peptide. Il est évident que les propriétés biochimiques et physiques de ce peptide ont eu un impact sur sa capacité à être fusionné. Cependant, les résultats obtenus donnent des indications concernant les endroits possibles pour faire des fusions sans modifier l'intégrité du PapMV. La fusion d'une protéine complète nécessiterait une étude plus approfondie considérant que sa fusion serait nettement plus radicale pour la structure de la capsid du PapMV.

L'utilisation de techniques autres que par la synthèse de virus chimériques pourrait être intéressante considérant l'effet de fusions sur la structure des protéines de la capsid. En effet, l'encombrement créé par la fusion diminue souvent le rendement de production et d'assemblage des virus. De plus, lorsque la production se fait en plante, il existe toujours un risque que la fusion soit éliminée par les mécanismes de réplication virale. Le «click-chemistry» pourrait être utilisé pour lier des groupements utiles à la vaccination tel que présenté chez le TMV (Bruckman et al., 2008). Une autre stratégie impliquant du SPDP a permis de lier chimiquement un peptide synthétique à un phage (van Houten et al., 2010). Une liaison chimique d'épitopes peut permettre de lier de plus gros peptides ou des protéines complètes sans compromettre l'état et l'assemblage de particules virales et les rendements de production. La synthèse de peptides coûte cependant excessivement cher et augmenterait ainsi le prix de production de vaccins.

La fusion d'un peptide sur une plateforme vaccinale est avantageuse considérant que la production nécessite une purification relativement identique entre les différentes fusions. Ainsi, il serait possible de produire plusieurs fusions sur une même particule dans un vaccin afin de protéger contre plus d'une maladie à la fois. Puisque certains peptides peuvent avoir une influence plus grande sur la stabilité des nanoparticules que d'autres, il serait intéressant de vacciner avec différentes particules présentant différents peptide en même temps. L'utilisation d'un ou plusieurs peptides immunodominants est cependant essentielle afin d'obtenir une protection complète contre un pathogène donné.

Chapitre 5 : Conclusion

Les deux projets décrits dans ce mémoire font état de la nécessité de mieux connaître la structure élémentaire du PapMV afin de mieux utiliser cet outil en immunologie. En effet, les déterminants de surface évalués dans la première étude permettront d'améliorer la compréhension des interactions du PapMV avec le système immunitaire pour pouvoir l'utiliser comme adjuvant. De plus, maintenant que les régions de surface sont mieux connues, il sera possible de faire des fusions à des endroits appuyés de données.

La vérification de la capacité du PapMV à accepter des fusions à partir d'un criblage insertionnel a apporté des informations importantes sur la plateforme vaccinale. La stabilité thermique des particules s'est révélée un critère de haute importance pour l'efficacité d'une plateforme vaccinale. Il est donc essentiel de porter une attention particulière à la capacité d'une plateforme à accepter des fusions.

En conclusion, le PapMV est un outil remarquable en nanotechnologie permettant de produire des vaccins, mais aussi des adjuvants pouvant être utilisés dans des préparations vaccinales. Son utilisation n'est pas limitée à la vaccination et à l'immunologie; la formation de nanostructures tubulaires est un atout important pour ce virus de plante qui pourrait s'avérer être un nouveau nanomatériau innovateur.

Bibliographie

Abouhaidar, M., Bancroft, J.B., 1978. The initiation of papaya mosaic virus assembly. *Virology* 90, 54-59.

Acosta-Ramírez, E., Pérez-Flores, R., Majeau, N., Pastelin-Palacios, R., Gil-Cruz, C., Ramírez-Saldaña, M., Manjarrez-Orduño, N., Cervantes-Barragán, L., Santos-Argumedo, L., Flores-Romo, L., Becker, I., Isibasi, A., Leclerc, D., López-Macías, C., 2008. Translating innate response into long-lasting antibody response by the intrinsic antigen-adjuvant properties of papaya mosaic virus. *Immunology* 124, 186-197.

Adams, M., Antoniw, J., Bar-Joseph, M., Brunt, A., Candresse, T., Foster, G., Martelli, G., Milne, R., Zavriev, S., Fauquet, C., 2004. The new plant virus family Flexiviridae and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archives of Virology* 149, 1045-1105.

Adams, M., Antoniw, J., Kreuze, J., 2009. Virgaviridae: a new family of rod-shaped plant viruses. *Archives of Virology* 154, 1967-2039.

Aguilar, J., Rodríguez, E., 2007. Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine* 25, 3752-3814.

Bachmann, M., Rohrer, U., Kündig, T., Bürki, K., Hengartner, H., Zinkernagel, R., 1993. The influence of antigen organization on B cell responsiveness. *Science (New York, N.Y.)* 262, 1448-1499.

Baratova, L.A., Grebenschikov, N.I., Dobrov, E.N., Gedrovich, A.V., Kashirin, I.A., Shishkov, A.V., Efimov, A.V., Järvekülg, L., Radavsky, Y.L., Saarma, M., 1992a. The organization of potato virus X coat proteins in virus particles studied by tritium planigraphy and model building. *Virology* 188, 175-180.

Baratova, L.A., Grebenschikov, N.I., Shishkov, A.V., Kashirin, I.A., Radavsky, J.L., Järvekülg, L., Saarma, M., 1992b. The topography of the surface of potato virus X: tritium planigraphy and immunological analysis. *Journal of General Virology* 73, 229-235.

Brennan, F., Jones, T., Hamilton, W., 2001. Cowpea mosaic virus as a vaccine carrier of heterologous antigens. *Molecular biotechnology* 17, 15-41.

Bruckman, M., Kaur, G., Lee, L., Xie, F., Sepulveda, J., Breitenkamp, R., Zhang, X., Joralemon, M., Russell, T., Emrick, T., Wang, Q., 2008. Surface modification of tobacco mosaic virus with "click" chemistry. *ChemBiochem : a European journal of chemical biology* 9, 519-542.

Callaway, A., Giesman-Cookmeyer, D., Gillock, E., Sit, T., Lommel, S., 2001. The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses. *Annual review of phytopathology* 39, 419-479.

Caspar, D., 1963. Assembly and stability of the Tobacco Mosaic Virus particle. *Advances in protein chemistry* 18, 37-158.

Cerovska, N., Hoffmeisterova, H., Moravec, T., Plchova, H., Folwarczna, J., Synkova, H., Ryslava, H., Ludvikova, V., Smahel, M., 2012. Transient expression of Human papillomavirus type 16 L2 epitope fused to N- and C-terminus of coat protein of Potato virus X in plants. *Journal of biosciences* 37, 125-158.

Chen, T.-H., Chen, T.-H., Hu, C.-C., Liao, J.-T., Lee, C.-W., Liao, J.-W., Lin, M.-Y., Liu, H.-J., Wang, M.-Y., Lin, N.-S., Hsu, Y.-H., 2012. Induction of protective immunity in chickens immunized with plant-made chimeric Bamboo mosaic virus particles expressing very virulent Infectious bursal disease virus antigen. *Virus research*.

Cruz, S.S., Chapman, S., Roberts, A.G., Roberts, I.M., Prior, D.A., Oparka, K.J., 1996. Assembly and movement of a plant virus carrying a green fluorescent protein overcoat. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 6286-6290.

Denis, J., Acosta-Ramirez, E., Zhao, Y., Hamelin, M.-E., Koukavica, I., Baz, M., Abed, Y., Savard, C., Pare, C., Lopez Macias, C., Boivin, G., Leclerc, D., 2008. Development of a universal influenza A vaccine based on the M2e peptide fused to the papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform. *Vaccine* 26, 3395-3403.

Denis, J., Majeau, N., Acosta-Ramirez, E., Savard, C., Bedard, M.-C., Simard, S., Lecours, K., Bolduc, M., Pare, C., Willems, B., Shoukry, N., Tessier, P., Lacasse, P., Lamarre, A., Lapointe, R., Lopez Macias, C., Leclerc, D., 2007. Immunogenicity of papaya mosaic virus-like particles fused to a hepatitis C virus epitope: Evidence for the critical function of multimerization. *Virology* 363, 59-68.

Erickson, J.W., Abouhaidar, M., Bancroft, J.B., 1978. The specificity of papaya mosaic virus assembly. *Virology* 90, 60-66.

Fitchen, J., Beachy, R., Hein, M., 1995. Plant virus expressing hybrid coat protein with added murine epitope elicits autoantibody response. *Vaccine* 13, 1051-1058.

Forster, R.L.S., Beck, D.L., Guilford, P.J., Voot, D.M., Van Dolleweerd, C.J., Andersen, M.T., 1992. The coat protein of white clover mosaic potyvirus has a role in facilitating cell-to-cell transport in plants. *Virology* 191, 480-484.

Harrison, B., Wilson, T., 1999. Milestones in the research on tobacco mosaic virus. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 354, 521-530.

Havlis, J., Thomas, H., Sebela, M., Shevchenko, A., 2003. Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. *Anal Chem* 75, 1300-1306.

Haynes, J.R., Cunningham, J., von Seefried, A., Lennick, M., Garvin, R.T., Shen, S.-H., 1986. Development of a Genetically-Engineered, Candidate Polio Vaccine Employing the Self-Assembling Properties of the Tobacco Mosaic Virus Coat Protein. *Nat Biotech* 4, 637-641.

Kalnciema, I., Skrastina, D., Ose, V., Pumpens, P., Zeltins, A., 2011. Potato Virus Y-Like Particles as a New Carrier for the Presentation of Foreign Protein Stretches. *Molecular biotechnology*.

Keller, A., Nesvizhskii, A.I., Kolker, E., Aebersold, R., 2002. Empirical Statistical Model To Estimate the Accuracy of Peptide Identifications Made by MS/MS and Database Search. *Analytical Chemistry* 74, 5383-5392.

Kendall, A., McDonald, M., Bian, W., Bowles, T., Baumgarten, S., Shi, J., Stewart, P., Bullitt, E., Gore, D., Irving, T., Havens, W., Ghabrial, S., Wall, J., Stubbs, G., 2008. Structure of flexible filamentous plant viruses. *Journal of virology* 82, 9546-9600.

Koenig, R., Lesemann, D.E., 2001. Plant virus identification. *eLS*.

Kumar, S., Ochoa, W., Singh, P., Hsu, C., Schneemann, A., Manchester, M., Olson, M., Reddy, V., 2009. Tomato bushy stunt virus (TBSV), a versatile platform for polyvalent display of antigenic epitopes and vaccine design. *Virology* 388, 185-275.

Lacasse, P., Denis, J., Lapointe, R., Leclerc, D., Lamarre, A., 2008. Novel Plant Virus-Based Vaccine Induces Protective Cytotoxic T-Lymphocyte-Mediated Antiviral Immunity through Dendritic Cell Maturation. *J. Virol.* 82, 785-794.

Laliberté Gagné, M.E., Lecours, K., Gagné, S., Leclerc, D., 2008. The F13 residue is critical for interaction among the coat protein subunits of papaya mosaic virus. *FEBS Journal* 275, 1474-1484.

Leclerc, D., 2011. Plant Viral Epitope Display Systems for Vaccine Development. *Current topics in microbiology and immunology*.

Leclerc, D., Beauseigle, D., Denis, J., Morin, H., Pare, C., Lamarre, A., Lapointe, R., 2007. Proteasome-Independent Major Histocompatibility Complex Class I Cross-Presentation Mediated by Papaya Mosaic Virus-Like Particles Leads to Expansion of Specific Human T Cells. *J. Virol.* 81, 1319-1326.

Lecours, K., Tremblay, M.-H., Gagné, M.-E.L., Gagné, S.M., Leclerc, D., 2006. Purification and biochemical characterization of a monomeric form of papaya mosaic potexvirus coat protein. *Protein Expression and Purification* 47, 273-280.

Lee, C.-C., Ho, Y.-N., Hu, R.-H., Yen, Y.-T., Wang, Z.-C., Lee, Y.-C., Hsu, Y.-H., Meng, M., 2011. The interaction between Bamboo mosaic virus replication protein and coat protein is critical for virus movement in plant hosts. *J. Virol.*, JVI.05595-05511.

Lico, C., Capuano, F., Renzone, G., Donini, M., Marusic, C., Scaloni, A., Benvenuto, E., Baschieri, S., 2006. Peptide display on Potato virus X: molecular features of the coat protein-fused peptide affecting cell-to-cell and phloem movement of chimeric virus particles. *Journal of General Virology* 87, 3103-3112.

Liu, L., Cañizares, M., Monger, W., Perrin, Y., Tsakiris, E., Porta, C., Shariat, N., Nicholson, L., Lomonosoff, G., 2005. Cowpea mosaic virus-based systems for the production of antigens and antibodies in plants. *Vaccine* 23, 1788-1880.

Lomonosoff, G., Evans, D., 2011. Applications of Plant Viruses in Bionanotechnology. *Current topics in microbiology and immunology*.

Lomonosoff, G., Johnson, J., 1991. The synthesis and structure of comovirus capsids. *Progress in biophysics and molecular biology* 55, 107-144.

Lukashina, E., Badun, G., Fedorova, N., Ksenofontov, A., Nemykh, M., Serebryakova, M., Mukhamedzhanova, A., Karpova, O., Rodionova, N., Baratova, L., Dobrov, E., 2009. Tritium planigraphy study of structural alterations in the coat protein of Potato virus X induced by binding of its triple gene block 1 protein to virions. *FEBS Journal* 276, 7006-7015.

Marconi, G., Albertini, E., Barone, P., De Marchis, F., Lico, C., Marusic, C., Rutili, D., Veronesi, F., Porceddu, A., 2006. In planta production of two peptides of the Classical Swine Fever Virus (CSFV) E2 glycoprotein fused to the coat protein of potato virus X. *BMC Biotechnology* 6, 29.

Marusic, C., Rizza, P., Lattanzi, L., Mancini, C., Spada, M., Belardelli, F., Benvenuto, E., Capone, I., 2001. Chimeric Plant Virus Particles as Immunogens for Inducing Murine and Human Immune Responses against Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Virol.* 75, 8434-8439.

Mendoza, V.L., Vachet, R.W., 2008. Protein Surface Mapping Using Diethylpyrocarbonate with Mass Spectrometric Detection. *Analytical Chemistry* 80, 2895-2904.

Mendoza, V.L., Vachet, R.W., 2009. Probing protein structure by amino acid-specific covalent labeling and mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 28, 785-815.

Morin, H., Tremblay, M.-H., Plante, É., Paré, C., Majeau, N., Hogue, R., Leclerc, D., 2007. High avidity binding of engineered papaya mosaic virus virus-like particles to resting spores of *Plasmodiophora Brassicae*. *Journal of Biotechnology* 128, 423-434.

Namba, K., Caspar, D., Stubbs, G., 1988. Enhancement and simplification of macromolecular images. *Biophysical journal* 53, 469-544.

O'Brien, G., Bryant, C., Voogd, C., Greenberg, H., Gardner, R., Bellamy, A., 2000. Rotavirus VP6 expressed by PVX vectors in *Nicotiana benthamiana* coats PVX rods and also assembles into viruslike particles. *Virology* 270, 444-497.

Ozeki, J., Hashimoto, M., Komatsu, K., Maejima, K., Himeno, M., Senshu, H., Kawanishi, T., Kagiwada, S., Yamaji, Y., Namba, S., 2009. The N-terminal Region of the *Plantago asiatica* mosaic virus Coat Protein Is Required for Cell-to-Cell Movement but Is Dispensable for Virion Assembly. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22, 677-685.

Pallas, V., García, J.A., 2011. How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *Journal of General Virology* 92, 2691-2705.

Plchova, H., Moravec, T., Hoffmeisterova, H., Folwarczna, J., Cerovska, N., 2011. Expression of Human papillomavirus 16 E7_{ggg} oncoprotein on N- and C-terminus of Potato virus X coat protein in bacterial and plant cells. *Protein Expression and Purification* 77, 146-152.

Porta, C., Spall, V., Loveland, J., Johnson, J., Barker, P., Lomonossoff, G., 1994. Development of cowpea mosaic virus as a high-yielding system for the presentation of foreign peptides. *Virology* 202, 949-1004.

Savard, C., Guérin, A., Drouin, K., Bolduc, M., Laliberté-Gagné, M.-E., Dumas, M.-C., Majeau, N., Leclerc, D., 2011. Improvement of the Trivalent Inactivated Flu Vaccine Using PapMV Nanoparticles. *PLoS ONE* 6, e21522.

Savard, C., Laliberté-Gagné, M.-È., Babin, C., Bolduc, M., Guérin, A., Drouin, K., Forget, M.-A., Majeau, N., Lapointe, R., Leclerc, D., 2012. Improvement of the PapMV nanoparticle adjuvant property through an increased of its avidity for the antigen [influenza NP]. *Vaccine* 30, 2535-2577.

Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M., 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68, 850-858.

Sit, T.L., Abouhaidar, M.G., Holy, S., 1989. Nucleotide Sequence of Papaya Mosaic Virus RNA. *Journal of General Virology* 70, 2325-2331.

Smith, M., Fitzmaurice, W., Turpen, T., Palmer, K., 2009. Display of peptides on the surface of tobacco mosaic virus particles. *Current topics in microbiology and immunology* 332, 13-44.

Steinmetz, N., Evans, D., 2007. Utilisation of plant viruses in bionanotechnology. *Organic & biomolecular chemistry* 5, 2891-3793.

Steinmetz, N., Lin, T., Lomonosoff, G., Johnson, J., 2009. Structure-based engineering of an icosahedral virus for nanomedicine and nanotechnology. *Current topics in microbiology and immunology* 327, 23-81.

Stubbs, G., Kendall, A., 2012. Helical viruses. *Advances in experimental medicine and biology* 726, 631-689.

Takanami, Y., 2006. Contributions of plant virus research to the biological sciences. *Journal of General Plant Pathology*.

Tremblay, M.-H., Majeau, N., Gagné, M.-E.L., Lecours, K., Morin, H., Duvignaud, J.-B., Bolduc, M., Chouinard, N., Paré, C., Gagné, S., Denis, L., 2006. Effect of mutations K97A and E128A on RNA binding and self assembly of papaya mosaic potexvirus coat protein. *FEBS Journal* 273, 14-25.

Uhde-Holzem, K., Schlösser, V., Viazov, S., Fischer, R., Commandeur, U., 2010. Immunogenic properties of chimeric potato virus X particles displaying the hepatitis C virus hypervariable region I peptide R9. *Journal of virological methods* 166, 12-32.

Uhde, K., Fischer, R., Commandeur, U., 2005. Expression of multiple foreign epitopes presented as synthetic antigens on the surface of Potato virus X particles. *Archives of Virology* 150, 327-340.

Usha, R., Rohll, J., Spall, V., Shanks, M., Maule, A., Johnson, J., Lomonosoff, G., 1993. Expression of an animal virus antigenic site on the surface of a plant virus particle. *Virology* 197, 366-440.

van Houten, N., Henry, K., Smith, G., Scott, J., 2010. Engineering filamentous phage carriers to improve focusing of antibody responses against peptides. *Vaccine* 28, 2174-2259.

Vasicek, L., O'Brien, J., Browning, K., Tao, Z., Liu, H.-W., Brodbelt, J., 2012. Mapping protein surface accessibility via an electron transfer dissociation selectively cleavable hydrazone probe. *Molecular & cellular proteomics : MCP*.

Verchot-Lubicz, J., 2005. A New Cell-to-Cell Transport Model for Potexviruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18, 283-290.

Verchot-Lubicz, J., Torrance, L., Solovyev, A.G., Morozov, S.Y., Jackson, A.O., Gilmer, D., 2010. Varied Movement Strategies Employed by Triple Gene Block- Encoding Viruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23, 1231-1247.

Verchot-Lubicz, J., Ye, C.-M., Bamunusinghe, D., 2007. Molecular biology of potexviruses: recent advances. *Journal of General Virology* 88, 1643-1655.

Yang, C.-D., Liao, J.-T., Lai, C.-Y., Jong, M.-H., Liang, C.-M., Lin, Y.-L., Lin, N.-S., Hsu, Y.-H., Liang, S.-M., 2007. Induction of protective immunity in swine by

recombinant bamboo mosaic virus expressing foot-and-mouth disease virus epitopes. *BMC Biotechnology* 7, 62.

Young, M., Willits, D., Uchida, M., Douglas, T., 2008. Plant viruses as biotemplates for materials and their use in nanotechnology. *Annual review of phytopathology* 46, 361-445.

Zhang, H., Todderud, E., Stubbs, G., 1993. Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of Papaya Mosaic Virus Coat Protein. *Journal of Molecular Biology* 234, 885-887.

Annexe I – Séquences des clones HA11

PapMV HA11-12

```

1 M A S T P N I A G Y P Y D V P D Y A F P 20
1 ATGGCATCCACACCCAACATAGCCGGGTACCCGTACGACGTTCCGGATTACGCGTTCCCC 60
21 A I T Q E Q M S S I K V D P T S N L L P 40
61 GCCATCACCCAGGAACAAATGAGCTCGATTAAGGTCGATCCAACGTCCAATCTTCTGCCC 120
41 S Q E Q L K S V S T L M V A A K V P A A 60
121 TCCCAAGAGCAGTTAAAGTCAGTGTCCACCCTCATGGTAGCTGCTAAGGTTCCAGCAGCC 180
61 S V T T V A L E L V N F C Y D N G S S A 80
181 AGTGTTACAACGTGGCATTGGAGTTGGTTAACTTCTGCTATGACAATGGGTCCAGCGCG 240
81 Y T T V T G P S S I P E I S L A Q L A S 100
241 TACACCACAGTGACTGGCCCATCATCAATACCGGAGATATCACTGGCACAATTGGCCAGC 300
101 I V K A S G T S L R K F C R Y F A P I I 120
301 ATTGTCAAAGCTTCCGGCACTTCCCTTAGGAAATTTCTGCCGGTACTTCGCGCCAATAATC 360
121 W N L R T D K M A P A N W E A S G Y K P 140
361 TGGAATCTGAGGACGGACAAAATGGCTCCTGCCAATTGGGAGGCCTCAGGATACAAGCCA 420
141 S A K F A A F D F F D G V E N P A A M Q 160
421 AGCGCCAAATTTGCCGCGTTCGACTTCTTCGACGGGGTGGAGAATCCGGCGGCCATGCAA 480
161 P P S G L T R S P T Q E E R I A N A T N 180
481 CCCCCTTCGGGACTAACCAGGTCGCCGACCCAGGAAGAGCGGATTGCCAATGCCACCAAC 540
181 K Q V H L F Q A A A Q D N N F A S N S A 200
541 AAACAGGTGCATCTCTTCCAAGCCGCGGCACAGGACAACAACCTTTGCCAGCAACTCCGCC 600
201 F I T K G Q I S G S T P T I Q F L P P P 220
601 TTCATCACCAAAGGCCAAATTTCTGGGTCAACCCCAACCATCCAATTCCTTCCACCCCC 660
221 E T S T T R H H H H H H * 233
661 GAAACTAGTACCACGCGTCACCATCACCATCACCATTAG 699

```

PapMV HA11-33

```

1 M A S T P N I A F P A I T Q E Q M S S I 20
1 ATGGCATCCACACCCAACATAgCcTTCCCCGCCATCACCCAGGAACAAATGAGCTCGATT 60
21 K V D P T S N L L G Y P Y D V P D Y A P 40
61 AAGGTCGATCCAACGTCCAATCTTCTGGGGTACCCGTACGACGTTCCGGATTACGCGCCC 120
41 S Q E Q L K S V S T L M V A A K V P A A 60
121 TCCCAAGAGCAGTTAAAGTCAGTGTCCACCCTCATGGTAGCTGCTAAGGTTCCAGCAGCC 180
61 S V T T V A L E L V N F C Y D N G S S A 80
181 AGTGTTACAACGTGGCATTGGAGTTGGTTAACTTCTGCTATGACAATGGGTCCAGCGCG 240
81 Y T T V T G P S S I P E I S L A Q L A S 100
241 TACACCACAGTGACTGGCCCATCATCAATACCGGAGATATCACTGGCACAATTGGCCAGC 300
101 I V K A S G T S L R K F C R Y F A P I I 120
301 ATTGTCAAAGCTTCCGGCACTTCCCTTAGGAAATTCTGCCGGTACTTCGCGCCAATAATC 360
121 W N L R T D K M A P A N W E A S G Y K P 140
361 TGGAATCTGAGGACGGACAAAATGGCTCCTGCCAATTGGGAGGCCTCAGGATACAAGCCA 420
141 S A K F A A F D F F D G V E N P A A M Q 160
421 AGCGCCAAATTTGCCGCGTTCGACTTCTTCGACGGGGTGGAGAATCCGGCGGCCATGCAA 480
161 P P S G L T R S P T Q E E R I A N A T N 180
481 CCCCCTTCGGGACTAACCAGGTCGCCGACCCAGGAAGAGCGGATTGCCAATGCCACCAAC 540
181 K Q V H L F Q A A A Q D N N F A S N S A 200
541 AAACAGGTGCATCTCTTCCAAGCCGCGGCACAGGACAACAACCTTTGCCAGCAACTCCGCC 600
201 F I T K G Q I S G S T P T I Q F L P P P 220
601 TTCATACCAAAGGCCAAATTTCTGGGTCAACCCCAACCATCCAATTCCTTCCACCCCCC 660
221 E T S T T R H H H H H H * 233
661 GAAACTAGTACCACGCGTCACCATCACCATCACCATTAG 699

```

PapMV HA11-84

```

1 M A S T P N I A F P A I T Q E Q M S S I 20
1 ATGGCATCCACACCCAACATAgCcTTCCCCGCCATCACCCAGGAACAAATGAGCTCGATT 60
21 K V D P T S N L L P S Q E Q L K S V S T 40
61 AAGGTCGATCCAACGTCCAATCTTCTGCCCTCCCAAGAGCAGTTAAAGTCAGTGTCCACC 120
41 L M V A A K V P A A S V T T V A L E L V 60
121 CTCATGGTAGCTGCTAAGGTTCCAGCAGCCAGTGTACAACGTGGCATTGGAGTTGGTT 180
61 N F C Y D N G S S A Y T T V T G P S S I 80
181 AACTTCTGCTATGACAATGGGTCCAGCGCGTACACCACAGTGACTGGCCCATCATCAATA 240
81 G Y P Y D V P D Y A P E I S L A Q L A S 100
241 GGGTACCCGTACGACGTTCCGGATTACGCGCCGGAGATATCACTGGCACAATTGGCCAGC 300
101 I V K A S G T S L R K F C R Y F A P I I 120
301 ATTGTCAAAGCTTCCGGCACTTCCCTTAGGAAATTCTGCCGGTACTTCGCGCCAATAATC 360
121 W N L R T D K M A P A N W E A S G Y K P 140
361 TGGAATCTGAGGACGGACAAAATGGCTCCTGCCAATTGGGAGGCCTCAGGATACAAGCCA 420
141 S A K F A A F D F F D G V E N P A A M Q 160
421 AGCGCCAAATTTGCCGCGTTCGACTTCTTCGACGGGGTGGAGAATCCGGCGGCCATGCAA 480
161 P P S G L T R S P T Q E E R I A N A T N 180
481 CCCCCTTCGGGACTAACCAGGTCGCCGACCCAGGAAGAGCGGATTGCCAATGCCACCAAC 540
181 K Q V H L F Q A A A Q D N N F A S N S A 200
541 AAACAGGTGCATCTCTTCCAAGCCGCGGCACAGGACAACAACCTTTGCCAGCAACTCCGCC 600
201 F I T K G Q I S G S T P T I Q F L P P P 220
601 TTCATACCAAAGGCCAAATTTCTGGGTCAACCCCAACCATCCAATTCCTTCCACCCCC 660
221 E T S T T R H H H H H H * 233
661 GAAACTAGTACCACGCGTCACCATCACCATCACCATTAG 699

```

PapMV HA11-122

```

1 M A S T P N I A F P A I T Q E Q M S S I 20
1 ATGGCATCCACACCCAACATAgCcTTCCCCGCCATCACCCAGGAACAAATGAGCTCGATT 60
21 K V D P T S N L L P S Q E Q L K S V S T 40
61 AAGGTCGATCCAACGTCCAATCTTCTGCCCTCCCAAGAGCAGTTAAAGTCAGTGTCCACC 120
41 L M V A A K V P A A S V T T V A L E L V 60
121 CTCATGGTAGCTGCTAAGGTTCCAGCAGCCAGTGTTACAACGTGGCATTGGAGTTGGTT 180
61 N F C Y D N G S S A Y T T V T G P S S I 80
181 AACTTCTGCTATGACAATGGGTCCAGCGCGTACACCACAGTGACTGGCCCATCATCAATA 240
81 P E I S L A Q L A S I V K A S G T S L R 100
241 CCGGAGATATCACTGGCACAATTGGCCAGCATTGTCAAAGCTTCCGGCACTTCCCTTAGG 300
101 K F C R Y F A P I I W N L R T D K M A G 120
301 AAATTCTGCCGGTACTTCGCGCCAATAATCTGGAATCTGAGGACGGACAAAATGGCTGGG 360
121 Y P Y D V P D Y A P A N W E A S G Y K P 140
361 TACCCGTACGACGTTCCGGATTACGCGCCTGCCAATTGGGAGGCCTCAGGATACAAGCCA 420
141 S A K F A A F D F F D G V E N P A A M Q 160
421 AGCGCCAAATTTGCCGCGTTCGACTTCTTCGACGGGGTGGAGAATCCGGCGGCCATGCAA 480
161 P P S G L T R S P T Q E E R I A N A T N 180
481 CCCCCTTCGGGACTAACCAGGTCGCCGACCCAGGAAGAGCGGATTGCCAATGCCACCAAC 540
181 K Q V H L F Q A A A Q D N N F A S N S A 200
541 AAACAGGTGCATCTCTTCCAAGCCGCGGCACAGGACAACAACCTTTGCCAGCAACTCCGCC 600
201 F I T K G Q I S G S T P T I Q F L P P P 220
601 TTCATACCAAAGGCCAAATTTCTGGGTCAACCCCAACCATCCAATTCCTTCCACCCCC 660
221 E T S T T R H H H H H H * 233
661 GAAACTAGTACCACGCGTCACCATCACCATCACCATTAG 699

```

PapMV HA11-134

```

1 M A S T P N I A F P A I T Q E Q M S S I 20
1 ATGGCATCCACACCCAACATAgCcTTCCCCGCCATCACCCAGGAACAAATGAGCTCGATT 60
21 K V D P T S N L L P S Q E Q L K S V S T 40
61 AAGGTCGATCCAACGTCCAATCTTCTGCCCTCCCAAGAGCAGTTAAAGTCAGTGTCCACC 120
41 L M V A A K V P A A S V T T V A L E L V 60
121 CTCATGGTAGCTGCTAAGGTTCCAGCAGCCAGTGTACAACACTGTGGCATTGGAGTTGGTT 180
61 N F C Y D N G S S A Y T T V T G P S S I 80
181 AACTTCTGCTATGACAATGGGTCCAGCGCGTACACCACAGTGACTGGCCCATCATCAATA 240
81 P E I S L A Q L A S I V K A S G T S L R 100
241 CCGGAGATATCACTGGCACAATTGGCCAGCATTGTCAAAGCTTCCGGCACTTCCCTTAGG 300
101 K F C R Y F A P I I W N L R T D K M A P 120
301 AAATTCTGCCGGTACTTCGCGCCAATAATCTGGAATCTGAGGACGGACAAAATGGCTCCT 360
121 A N W E A S G Y K P G Y P Y D V P D Y A 140
361 GCCAATTGGGAGGCCTCAGGATACAAGCCAGGGTACCCGTACGACGTTCCGGATTACGCG 420
141 S A K F A A F D F F D G V E N P A A M Q 160
421 AGCGCCAAATTTGCCGCGTTCGACTTCTTCGACGGGGTGGAGAATCCGGCGGCCATGCAA 480
161 P P S G L T R S P T Q E E R I A N A T N 180
481 CCCCCTTCGGGACTAACCAGGTCGCCGACCCAGGAAGAGCGGATTGCCAATGCCACCAAC 540
181 K Q V H L F Q A A A Q D N N F A S N S A 200
541 AAACAGGTGCATCTCTTCCAAGCCGCGGCACAGGACAACAACCTTTGCCAGCAACTCCGCC 600
201 F I T K G Q I S G S T P T I Q F L P P P 220
601 TTCATACCAAAGGCCAAATTTCTGGGTCAACCCCAACCATCCAATTCCTTCCACCCCCC 660
221 E T S T T R H H H H H H * 233
661 GAAACTAGTACCACGCGTCACCATCACCATCACCATTAG 699

```

PapMV HA11-162

```

1 M A S T P N I A F P A I T Q E Q M S S I 20
1 ATGGCATCCACACCCAACATAgCcTTCCCCGCCATCACCCAGGAACAAATGAGCTCGATT 60
21 K V D P T S N L L P S Q E Q L K S V S T 40
61 AAGGTCGATCCAACGTCCAATCTTCTGCCCTCCCAAGAGCAGTTAAAGTCAGTGTCCACC 120
41 L M V A A K V P A A S V T T V A L E L V 60
121 CTCATGGTAGCTGCTAAGGTTCCAGCAGCCAGTGTACAACGTGGCATTGGAGTTGGTT 180
61 N F C Y D N G S S A Y T T V T G P S S I 80
181 AACTTCTGCTATGACAATGGGTCCAGCGCGTACACCACAGTGACTGGCCCATCATCAATA 240
81 P E I S L A Q L A S I V K A S G T S L R 100
241 CCGGAGATATCACTGGCACAATTGGCCAGCATTGTCAAAGCTTCCGGCACTTCCCTTAGG 300
101 K F C R Y F A P I I W N L R T D K M A P 120
301 AAATTCTGCCGGTACTTCGCGCCAATAATCTGGAATCTGAGGACGGACAAAATGGCTCCT 360
121 A N W E A S G Y K P S A K F A A F D F F 140
361 GCCAATTGGGAGGCCTCAGGATACAAGCCAAGCGCCAAATTTGCCGCGTTCGACTTCTTC 420
141 D G V E N P A A M Q P P S G L T R S G Y 160
421 GACGGGGTGGAGAATCCGGCGGCCATGCAACCCCTTCGGGACTAACCAGGTCCGGGTAC 480
161 P Y D V P D Y A P T Q E E R I A N A T N 180
481 CCGTACGACGTTCGGATTACGCGCCGACCCAGGAAGAGCGGATTGCCAATGCCACCAAC 540
181 K Q V H L F Q A A A Q D N N F A S N S A 200
541 AAACAGGTGCATCTCTTCCAAGCCGCGGCACAGGACAACAACCTTTGCCAGCAACTCCGCC 600
201 F I T K G Q I S G S T P T I Q F L P P P 220
601 TTCATACCAAAGGCCAAATTTCTGGGTCAACCCCAACCATCCAATTCCTTCCACCCCC 660
221 E T S T T R H H H H H H * 233
661 GAAACTAGTACCACGCGTCACCATCACCATCACCATTAG 699

```

PapMV HA11-187

```

1 M A S T P N I A F P A I T Q E Q M S S I 20
1 ATGGCATCCACACCCAACATAgCcTTCCCCGCCATCACCCAGGAACAAATGAGCTCGATT 60
21 K V D P T S N L L P S Q E Q L K S V S T 40
61 AAGGTCGATCCAACGTCCAATCTTCTGCCCTCCCAAGAGCAGTTAAAGTCAGTGTCCACC 120
41 L M V A A K V P A A S V T T V A L E L V 60
121 CTCATGGTAGCTGCTAAGGTTCCAGCAGCCAGTGTTACAACGTGGCATTGGAGTTGGTT 180
61 N F C Y D N G S S A Y T T V T G P S S I 80
181 AACTTCTGCTATGACAATGGGTCCAGCGCGTACACCACAGTGACTGGCCCATCATCAATA 240
81 P E I S L A Q L A S I V K A S G T S L R 100
241 CCGGAGATATCACTGGCACAATTGGCCAGCATTGTCAAAGCTTCCGGCACTTCCCTTAGG 300
101 K F C R Y F A P I I W N L R T D K M A P 120
301 AAATTCTGCCGGTACTTCGCGCCAATAATCTGGAATCTGAGGACGGACAAAATGGCTCCT 360
121 A N W E A S G Y K P S A K F A A F D F F 140
361 GCCAATTGGGAGGCCTCAGGATACAAGCCAAGCGCCAAATTTGCCGCGTTCGACTTCTTC 420
141 D G V E N P A A M Q P P S G L T R S P T 160
421 GACGGGGTGGAGAATCCGGCGGCCATGCAACCCCTTCGGGACTAACCAGGTCGCCGACC 480
161 Q E E R I A N A T N K Q V H L F Q A A A 180
481 CAGGAAGAGCGGATTGCCAATGCCACCAACAAACAGGTGCATCTCTTCCAAGCCGCGGCA 540
181 Q D G Y P Y D V P D Y A N N F A S N S A 200
541 CAGGACGGGTACCCGTACGACGTTCCGGATTACGCGAACAACCTTTGCCAGCAACTCCGCC 600
201 F I T K G Q I S G S T P T I Q F L P P P 220
601 TTCATACCAAAGGCCAAATTTCTGGGTCAACCCCAACCATCCAATTCCTTCCACCCCC 660
221 E T S T T R H H H H H H * 233
661 GAAACTAGTACCACGCGTCACCATCACCATCACCATTAG 699

```

PapMV HA11-C

```

1 M A S T P N I A F P A I T Q E Q M S S I 20
1 ATGGCATCCACACCCAACATAgCcTTCCCCGCCATCACCCAGGAACAAATGAGCTCGATT 60
21 K V D P T S N L L P S Q E Q L K S V S T 40
61 AAGGTCGATCCAACGTCCAATCTTCTGCCCTCCCAAGAGCAGTTAAAGTCAGTGTCCACC 120
41 L M V A A K V P A A S V T T V A L E L V 60
121 CTCATGGTAGCTGCTAAGGTTCCAGCAGCCAGTGTTACAACGTGGCATTGGAGTTGGTT 180
61 N F C Y D N G S S A Y T T V T G P S S I 80
181 AACTTCTGCTATGACAATGGGTCCAGCGCGTACACCACAGTGACTGGCCCATCATCAATA 240
81 P E I S L A Q L A S I V K A S G T S L R 100
241 CCGGAGATATCACTGGCACAATTGGCCAGCATTGTCAAAGCTTCCGGCACTTCCCTTAGG 300
101 K F C R Y F A P I I W N L R T D K M A P 120
301 AAATTCTGCCGGTACTTCGCGCCAATAATCTGGAATCTGAGGACGGACAAAATGGCTCCT 360
121 A N W E A S G Y K P S A K F A A F D F F 140
361 GCCAATTGGGAGGCCTCAGGATACAAGCCAAGCGCCAAATTTGCCGCGTTCGACTTCTTC 420
141 D G V E N P A A M Q P P S G L T R S P T 160
421 GACGGGGTGGAGAATCCGGCGGCCATGCAACCCCTTCGGGACTAACCAGGTCCGCCGACC 480
161 Q E E R I A N A T N K Q V H L F Q A A A 180
481 CAGGAAGAGCGGATTGCCAATGCCACCAACAAACAGGTGCATCTCTTCCAAGCCGCGGCA 540
181 Q D N N F A S N S A F I T K G Q I S G S 200
541 CAGGACAACAACCTTTGCCAGCAACTCCGCCTTCATCACCAAAGGCCAAATTTCTGGGTCA 600
201 T P T I Q F L P P P E T S T G Y P Y D V 220
601 ACCCCAACCATCCAATTCCTTCCACCCCCGAAACTAGTACCGGGTACCCGTACGACGTT 660
221 P D Y A T R H H H H H H * 233
661 CCGGATTACGCGACGCGTCACCATCACCATCACCATTAG 699

```


Annexe II – Milieux et tampons

Production de protéines :

- Milieu - 2XYT (1 L) :
 - 16g de peptone
 - 10g d'extrait de levure
 - 5g de NaCl
 - 800 ml d'eau distillée
 - pH 7.0

- Milieu - Agar 2XYT + Ampicilline :
 - Milieu 2XYT liquide
 - 20g d'agar
 - Ampicilline 50 µg/ml

Purification de protéines :

- Tampon de lyse (Lysis Buffer) :
 - 50 mM NaH₂PO₄
 - 300 mM NaCl
 - 10 mM imidazole
 - pH 8,0

- Tampon de lavage 1 :
 - 50 mM NaH₂PO₄
 - 300 mM NaCl
 - 20 mM imidazole
 - pH 8,0

- Tampon de lavage 2 :
 - 50 mM NaH₂PO₄
 - 300 mM NaCl
 - 50 mM imidazole
 - pH 8,0

- Tampon de lavage 3 :
 - 10 mM Tris-HCl
 - 50 mM imidazole
 - 0,5% Triton 100X
 - pH 8,0

- Tampon de lavage 4 :
 - 10 mM Tris-HCl
 - 50 mM imidazole
 - pH 8,0

- Tampon de lavage 5 :
10 mM Tris-HCl
1% Zwittergent
pH 8,0

- Tampon d'éluion :
10 mM Tris-HCl
1 M imidazole
pH 8,0

Annexe III – Production et purification du PapMV

Transformation de bactéries compétentes Bl21

1. Récupérer un tube de 100 μ l de bactéries compétentes Bl21 (DE3) RIL (Stratagene) du -80°C et les placer sur glace.
2. Ajouter 100 ng d'ADN du plasmide désirés aux cellules compétentes. Incuber pour 30 minutes sur glace.
3. Faire un choc thermique de 20 secondes dans un bain à 42°C et remettre sur glace pour 2 minutes.
4. Ajouter 900 μ l de milieu 2XYT au tube de cellules et incuber 45 minutes à 37°C .
5. Centrifuger le tube de cellules à 15 800 x g pendant 15 secondes. Jeter 900 μ l du surnageant et mélanger le culot dans le 100 μ l restant.
6. Étendre le 100 μ l sur du milieu solide Agar-2XYT contenant de l'ampicilline et incuber à 37°C pendant 16 heures.

Induction de la production des protéines :

1. 20 ml de milieu de culture 2XYT et 20 μ l d'ampicilline (50 mg/ml) est inoculée avec 10 colonies de la transformation de bactéries compétentes Bl21.
2. Incubée à 37°C avec agitation (250 RPM) pendant 4 heures.
3. 500 ml de milieu de culture 2XYT contenant 500 μ l d'ampicilline (50 mg/ml) est inoculée avec la pré-culture.
4. Incuber à 37°C avec agitation (250 RPM) jusqu'à ce que la densité optique à 600 nm soit d'environ 0,6.
5. Induire avec 500 μ l (1 mM) d'isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) et 250 μ l d'ampicilline (50 mg/ml).
6. Incuber à 22°C avec agitation (250 RPM) pendant 16 heures.

Lyse des bactéries

1. Centrifuger la culture pendant 15 minutes à 8000 RPM à 4°C .
2. Resuspendre le culot avec 20 ml de tampon de lyse froid.
3. Ajouter 40 μ l de PMSF 20 mM (40 μ M) à la suspension bactérienne et la congeler à -80°C pour un minimum de 16 heures.

4. Dégeler le culot dans un bain d'eau glacée et ajouter 135 µl de cocktail inhibiteur de protéases 25X (Roche).
5. Lyser les bactéries à l'aide de la Presse de French à une pression de 750 PSIG.
6. Ajouter 900 µl de DNASE 10 000 U/ml (Sigma, catalogue # D5025) et 1.5 ml de MgCl₂ 1M filtré.
7. Agiter à température pièce pendant 15 minutes.
8. Centrifuger à 13 000 RPM pendant 45 minutes à 4°C.
9. Centrifuger le surnageant à 13 000 RPM pendant 20 minutes à 4°C.
10. Laver 6 ml de billes Ni-NTA (QIAGEN, catalogue # 30230) à deux reprises avec 35 ml de tampon de lyse froid.
11. Centrifuger les billes de nickel à 1500 RPM pendant 2 minutes.
12. Ajouter le surnageant de bactéries aux billes et incubé pendant 16 heures à 4°C sous agitation.

Purification des protéines :

1. Centrifuger les billes et les laver avec 30 ml de tampon phosphate contenant des quantités croissantes d'imidazole (Tampon de lavage 1 et 2).
2. Mettre les billes sur une colonne de polypropylène.
3. Laver à deux reprises avec 5 ml de tampon de lavage 2.
4. Laver les billes avec 15 ml de tampon de lavage contenant 0,5% de Triton 100X et à deux reprises avec 20 ml de tampon de lavage 4.
5. Incuber les billes avec 5 ml de tampon de lavage 5 contenant 1% de Zwittergent pendant 30 minutes.
6. Répéter la dernière étape à 3 reprises.
7. Laver les billes à 2 reprises avec 20 ml de tampon de lavage 4.
8. Incuber les billes avec 5 ml de tampon d'éluat pendant 16 heures.
9. Récupérer l'éluat contenant les protéines.
10. Ajouter 2,5 ml de tampon d'éluat aux billes et récolter l'éluat après une heure d'incubation.
11. Dialyser les protéines pendant 2 heures avec 1 L de tampon 10 mM Tris-HCl pH 8.0 froid à 2 reprises. La dernière dialyse est incubée pendant 16 heures.