

2m 11.2593.6

Université de Montréal

**Étude moléculaire de l'interaction entre la protéine $\sigma 3$ de
réovirus et l'ARN bicaténaire**

par

Josée Bergeron

Département de Microbiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures en vue de
l'obtention du grade de Maîtrise ès Science (M. Sc.) en Microbiologie et
Immunologie

Décembre, 1997

© Josée Bergeron



2002

W

4

U58

1998

v.026

Université de Montréal

Étude moléculaire de l'interaction entre la protéine
réovirus et l'ARN bicaténaire

par

Josée Bergeron

Département de Microbiologie et Immunologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures en vue de
l'obtention du grade de Maître en Sciences (M.Sc.) en Microbiologie et
Immunologie

December 1997

Josée Bergeron



Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé:

**Étude moléculaire de l'interaction entre la protéine $\sigma 3$ de
réovirus et l'ARN bicaténaire**

présenté par:

Josée Bergeron

a été évalué par un jury composé des
personnes suivantes

Dr. Pierre Belhumeur: président-rapporteur

Dr. Guy Lemay: directeur de recherche

Dr. Luc DesGroseillers: membre du jury

Mémoire accepté le: 04.12.1997

Sommaire

La protéine σ_3 , codée par le gène S4 de réovirus, est une métalloprotéine à zinc ayant de l'affinité pour l'ARN bicaténaire. Elle est retrouvée en association avec les polypeptides μ_1/μ_1C au niveau de la capside externe des virions. La protéine est divisée en deux domaines fonctionnels: le domaine amino-terminal renferme le motif de liaison au zinc alors que le domaine carboxy-terminal possède deux motifs riches en acides aminés basiques, conférant à la protéine sa capacité à lier l'ARN bicaténaire.

La région amino-terminale de σ_3 est impliquée dans le clivage de μ_1 en μ_1C tandis que la région carboxy-terminale est responsable de la régulation de la synthèse des protéines cellulaires en séquestrant l'ARN bicaténaire, activateur de la protéine kinase cellulaire ARN-dépendante (PKR). Il semble que le deuxième motif basique (acides aminés 291 à 298) soit plus important que le premier dans l'interaction directe de la protéine avec l'ARN bicaténaire alors que le premier motif (acides aminés 233 à 240) soit nécessaire à la prévention de l'effet inhibiteur du domaine amino-terminal sur l'attachement de la protéine à l'ARN bicaténaire.

Dans le but de cibler spécifiquement les acides aminés de la région amino-terminale de σ_3 responsables de l'effet inhibiteur exercé sur l'attachement de la protéine à l'ARN bicaténaire, nous avons déterminé la capacité à lier l'ARN bicaténaire de protéines σ_3 renfermant soit des mutations au niveau du motif à doigt de zinc, soit la mutation N16K retrouvée chez un réovirus thermosensible (ts453). Les essais d'attachement sur filtre de l'ARN bicaténaire radioactif nous ont permis de

conclure que ces mutations augmentent l'affinité de la protéine $\sigma 3$ pour l'ARN bicaténaire.

Le virus ts453 est défectif au niveau du gène S4 et produit, à haute température (37°C), des particules virales dépourvues de capsid externe. Puisque la protéine $\sigma 3$ N16K ne peut s'associer avec $\mu 1$ pour générer le produit de clivage $\mu 1C$, l'existence du virus ts453 nous permet d'établir une corrélation entre les propriétés de la protéine recombinante $\sigma 3$ N16K et les effets observés au cours d'une infection virale. Ainsi, nous avons poursuivi la caractérisation de la protéine $\sigma 3$ N16K.

La protéine mutante N16K conserve son affinité pour le zinc et, lors d'essais de fractionnement cellulaire, elle est retrouvée en plus grande quantité que la protéine de type sauvage dans le noyau de cellules COS transfectées de façon transitoire. Il semble donc que la localisation nucléaire de $\sigma 3$ soit associée à la capacité de la protéine à lier l'ARN bicaténaire.

Le traitement de cellules de mammifères avec l'interféron, stimule celles-ci à produire un niveau élevé de la PKR. En présence d'ARN bicaténaire, l'activation de la PKR entraîne une inhibition de la synthèse protéique suite à une phosphorylation du facteur d'initiation eIF-2 α . Afin de déterminer si le virus ts453 présentait une résistance accrue à l'effet antiviral induit par l'interféron, nous avons infecté des cellules L929, préalablement traitées à l'interféron- β , avec des virions ts453 et des particules sous-virales infectieuses dépourvues de molécules $\sigma 3$. Nous avons constaté que les virions ts453 sont plus résistants à l'effet de l'interféron que le virus de type sauvage, et que cette propriété est perdue chez les particules dépourvues de $\sigma 3$. Les

résultats obtenus témoignent donc de l'importance de l'affinité pour l'ARN bicaténaire des molécules σ_3 provenant des réovirions dans la régulation de la synthèse protéique.

Finalement, afin de poursuivre l'étude de σ_3 , la protéine a été exprimée à l'aide d'un système d'expression de protéines hétérologues employant la levure *Pichia pastoris*, et une fraction enrichie pour σ_3 a été obtenue en procédant à une purification en deux étapes (concentration au sulfate d'ammonium et chromatographie d'affinité). Il a également été possible d'établir une lignée cellulaire de souris (SC1-tTA/S4) permettant de contrôler les niveaux d'expression de la protéine σ_3 .

Table des matières

Sommaire	III
Table des matières	VI
Liste des tableaux	VIII
Liste des figures	IX
Liste des abréviations I	XI
Liste des abréviations II	XIII
Remerciements	XIV
 <i>Chapitre 1</i>	 <i>1</i>
Revue de littérature	
1. Classification	2
2. Structure du réovirus	3
2.1 Morphologie des particules virales et sous-virales	3
2.2 Composition en acides nucléiques	5
3. Cycle de multiplication des réovirus	7
3.1 Adsorption, pénétration et décapsidation des virions	7
3.2 Phase précoce	9
3.3 Phase tardive	11
3.4 ARNm réoviraux	12
4. Pathogénicité des réovirus	13
4.1 Infection naturelle	13
4.2 Infection chez le modèle animal	15
5. Interaction virus-cellule	18
5.1 Changements morphologiques	18
5.2 Altérations du métabolisme cellulaire	18
5.3 Établissement d'infections persistantes	21
5.4 Production d'interféron	23
6. Rôles de la protéine kinase ARN-dépendante (PKR)	26
6.1 Structure de la PKR	26
6.2 Activation de la PKR	28
6.3 Conséquences de l'activation de la PKR	30
6.4 Régulation de la PKR par les virus	32
7. Relation entre la structure et la fonction de la protéine σ_3 de réovirus	35
7.1 Structure de la protéine σ_3	35
7.2 Région amino-terminale	37
7.3 Région carboxy-terminale	40
7.4 Rôle de la protéine σ_3 dans la régulation de la synthèse protéique	41

8. Objectif du projet	43
Chapitre 2	56
Article	
Avant propos	57
Characterization of the Thermosensitive ts453 Reovirus Mutant: Increased dsRNA Binding and Altered Subcellular Localization of $\sigma 3$ Protein Correlates with Interferon Resistance	58
Abstract	59
Introduction	61
Materials and methods	65
Results	72
Discussion	78
Acknowledgments	84
References	85
Chapitre 3	109
Contributions au développement de systèmes d'expression de protéines hétérologues à partir du gène cloné codant pour la protéine $\sigma 3$ de réovirus	
Avant propos	110
1. Introduction	111
2. Expression de $\sigma 3$ chez la levure <i>Pichia pastoris</i>	114
2.1 Principe du système d'expression chez <i>Pichia pastoris</i>	114
2.2 Clonage du gène S4 codant pour $\sigma 3$ dans le vecteur d'expression pHIL-D2	115
2.3 Production et purification de la protéine $\sigma 3$	116
3. Établissement de lignées cellulaires permettant le contrôle du niveau d'expression de $\sigma 3$	120
3.1 Principe du système exprimant des protéines hétérologues de façon régulée	120
3.2 Première étape: expression de la protéine transactivatrice	121
3.3 Deuxième étape: expression de la protéine $\sigma 3$	123
Chapitre 4	134
Discussion	
Chapitre 5	149
Bibliographie	

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau. Segments composant le génome du réovirus T3D et leurs protéines correspondantes.

48

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1. Schéma de la capside externe du réovirion.	46
Figure 2. Segments d'ARN bicaténaire composant le génome des réovirus T2J (1), T1L (2), et T3D, (3).	47
Figure 3. Cycle de multiplication des réovirus.	49
Figure 4. Structure de la PKR.	50
Figure 5. Mécanisme d'activation de la PKR.	51
Figure 6. Initiation de la traduction chez les cellules eucaryotes.	52
Figure 7. Libération du facteur d'initiation eIF-2.	53
Figure 8. Mécanismes antiviraux pour inhiber l'activation de la PKR.	54
Figure 9. Structure de la protéine $\sigma 3$.	55

Chapitre 2

Figure 1. Schematic representation of the different mutations within the N-terminal portion and the first C-terminal basic motif of $\sigma 3$ expression vectors.	95
Figure 2. Double-stranded RNA-binding of the different $\sigma 3$ mutant proteins.	97
Figure 3. Zinc-binding ability of the $\sigma 3$ protein harboring the thermosensitive mutation (N16K).	99
Figure 4. Subcellular localization of the wild-type and N16K $\sigma 3$ protein.	101
Figure 5. Immunoelectron microscopy localization of $\sigma 3$ protein.	103
Figure 6. Effect of interferon on synthesis of viral proteins following infection of L929 cells with virions or ISVPs.	105
Figure 7. Uncoating efficiency of the ts453 virus. Radiolabeled wild-type (T3D) or ts453 virus was adsorbed onto L929 cells.	107

Chapitre 3

Figure 1. Voie métabolique du méthanol à l'intérieur des péroxisomes de <i>Pichia pastoris</i> .	127
Figure 2. Exemple d'un évènement de recombinaison permettant l'intégration du gène S4 dans le génome de <i>Pichia pastoris</i> .	128

- Figure 3.** Immunoempreinte d'extraits protéiques provenant de divers recombinants de levure à l'aide d'un sérum antiréovirus de lapin. 129
- Figure 4.** Purification sur résine de zinc d'un extrait protéique provenant d'un clone de levure exprimant $\sigma 3$. 130
- Figure 5.** Système permettant de contrôler les niveaux d'expression de protéines hétérologues. 131
- Figure 6.** Pourcentage d'activité CAT de différents clones SC1 exprimant la protéine transactivatrice en présence et en absence de tétracycline. 132
- Figure 7.** Immunoprécipitation de différents clones SC1 exprimant la protéine transactivatrice (tTA) et transfectés avec le vecteur codant pour la protéine $\sigma 3$. 133

Liste des abréviations I

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN, ARNm, ARNt	Acide ribonucléique (messenger, de transfert)
ATP	Adénosine triphosphate
ATPase	Adénosine triphosphatase
CAT	Chloramphénicol acétyl-transférase
CBP	<i>Cap-Binding Proteins</i>
COS	Cellules de singe transformées par SV40
dsRNA	<i>double-stranded RNA</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
eIF-2, eIF-4	<i>Eucaryotic Initiation Factor-2, 4</i>
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	<i>Guanosine Nucleotide Exchange Factor</i>
GTP	Guanosine triphosphate
IFN	<i>Interferon</i>
IPTG	<i>Isopropyl-1-thio-β-D-galactoside</i>
ISVPs	<i>Infectious Subviral Particles</i>
kDa	Kilodalton
L929	Clone 929 de fibroblaste de souris
MBP	<i>Maltose-Binding Protein</i>
Met-tRNA	<i>Methionyl-tRNA</i>
m⁷GTP	7-méthylguanosine tri-phosphate
P1	<i>Polyprotein 1</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PKR	<i>Protein Kinase dsRNA Dependent</i>
SC1	Fibroblastes de souris embryonnaire

SDS

Sodium Dodecyl Sulfate

SDS-PAGE

SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SV40

Simian Virus 40

VP16

Virion Polypeptide 16

Liste des abréviations II: abréviations des acides aminés

<u>Acides aminés</u>	<u>Symbole de trois lettres</u>	<u>Symbole d'une lettre</u>
Acide aspartique	Asp	D
Acide glutamique	Glu	E
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Cystéine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Dr. Guy Lemay, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Votre disponibilité, vos conseils, et encouragements ont été très profitables. Merci.

Je voudrais remercier l'ensemble de mes collègues de travail qui ont contribué à rendre mon séjour des plus agréables et particulièrement Carole Danis pour ses conseils techniques.

Un merci tout spécial à mes parents, Noëlla et Marcel Bergeron, et à mes amis pour leur patience et leurs encouragements.

Enfin, je remercie le Fond pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) de même que mon directeur de recherche pour leur soutien financier.

À mes parents

À mes amis

'De la discussion jaillit la lumière'

Quitard

Chapitre 1
Revue de littérature

1. Classification

Le mode de réplication, la nature du génome et les caractéristiques structurales des réovirus ont permis de les classer parmi les virus membres de la famille des Reoviridae. Le terme 'réovirus' a été proposé par Albert Sabin en 1959 (Sabin, 1959) afin de regrouper bon nombre de virus qui furent isolés de tractus respiratoires et gastrointestinaux sans pour autant entraîner de graves pathologies chez les humains infectés; le préfix réo- est donc l'acronyme pour 'respiratory enteric orphan viruses'. Ainsi, les réovirus de mammifères constituent le prototype du genre *Reovirus* (ou *Orthoreovirus*), l'un des six genres qui représente cette famille.

Les réovirus de mammifères peuvent également être subdivisés en trois groupes sérologiques suivant des tests de neutralisation et d'inhibition de l'hémagglutination. Il s'agit du sérotype 1, représenté entre autres par la souche 'Lang' (T1L), du sérotype 2, dont le prototype est la souche D5 Jones isolée d'un enfant atteint de diarrhée (T2J), et du sérotype 3 ayant pour modèles les souches 'Dearing' et 'Abney' isolés respectivement d'enfants atteints de désordres intestinaux et respiratoires (Rosen, 1960; Rosen, 1962; Sabin, 1959).

Les cinq genres additionnels qui composent la famille des Reoviridae sont: les *Rotavirus* et *Orbivirus* qui, tout comme le genre *Reovirus*, infectent principalement les humains et les animaux vertébrés, de même que les *Cypovirus*, *Phytoreovirus* et *Fijivirus* qui infectent, quant à eux, les insectes et les plantes.

2. Structure du réovirion

2.1 Morphologie des particules virales et sous-virales

Les réovirus sont des virus non-enveloppés de forme sphérique, dont le diamètre varie autour de 850 Å. Le virion possède deux capsides icosaédriques (capside interne et externe) qui sont facilement visibles en microscopie électronique. Cette double capside est composée de huit protéines structurales et renferme un génome d'ARN bicaténaire divisé en 10 segments. (pour revue: Schiff and Fields, 1990).

La capside externe du réovirus est formée principalement des protéines σ_3 , μ_1/μ_1C et σ_1 (Lee *et al.*, 1981a; Lee *et al.*, 1981b; Smith *et al.*, 1969). Aux sommets de l'icosaèdre on retrouve des pentamères de protéines λ_2 , lesquels sont disposés de sorte à former des projections depuis la capside interne jusqu'à la surface externe du virion (Hayes *et al.*, 1981). L'ensemble des complexes $\sigma_3\text{-}\mu_1$, $\lambda_2\text{-}\sigma_3$ et $\lambda_2\text{-}\mu_1$, contribue grandement à la stabilité du réovirion dans l'environnement (Dryden *et al.*, 1993). La protéine σ_1 est responsable de l'attachement du réovirus aux récepteurs cellulaires et détermine la spécificité sérologique des trois sérotypes de réovirus (Lee *et al.*, 1981c; Schiff and Fields, 1990). Elle possède une structure filamenteuse associée à un domaine globulaire et serait retrouvée sous forme de trimères. Les extrémités globulaires émergent du centre du pentamère formé des protéines λ_2 .

(Dryden *et al.*, 1993; Fraser *et al.*, 1990; Furlong *et al.*, 1988; Gilmore *et al.*, 1996; Leone *et al.*, 1991; Strong *et al.*, 1991). (figure 1).

En plus de la capsid externe, une deuxième capsid participe à la protection du génome d'ARN bicaténaire. Cette deuxième couche protéique constitue la capsid interne (600 Å de diamètre) et est formée majoritairement des protéines $\lambda 1$, $\sigma 2$ et $\lambda 2$. Cette capsid est également composée de quelques molécules des protéines $\lambda 3$ et $\mu 2$ (Smith *et al.*, 1969). Les protéines de la capsid interne sont principalement associées aux différentes activités enzymatiques du virion (transcriptase et réplique). À titre d'exemple, la protéine $\lambda 3$ serait l'ARN polymérase ARN-dépendante responsable de la transcription des gènes viraux en ARNm (Morozov, 1989), la protéine $\lambda 2$ présenterait l'activité guanylyltransférase nécessaire à l'addition de la structure coiffe à l'extrémité 5' des ARNm viraux (Cleveland *et al.*, 1986; Seliger *et al.*, 1992), tandis que la protéine $\lambda 1$, dues à ses activités en tant que NTPase, hélicase et triphosphatase, interviendrait tant au niveau de la transcription des ARNm qu'au niveau de la synthèse des structures coiffe ((Bisaillon *et al.*, ; Noble and Nibert, 1997) et résultats non-publiés).

Lors des étapes précoces du cycle de multiplication des réovirus, deux types de particules sous-virales existent: soit les particules sous-virales infectieuses (ISVPs) et les nucléoïdes. Les ISVPs sont générées par dégradation protéolytique des réovirions, soit au niveau des vésicules lysosomales de cellules infectées (Sturzenbecker *et al.*, 1987), soit au niveau de l'intestin de souris infectées suite à l'ingestion de particules virales (Bodkin *et al.*, 1989). Elles se distinguent par l'absence de la protéine $\sigma 3$ de la

capside externe et par la présence de fragments provenant du clivage de $\mu 1/\mu 1C$ (ϕ et δ) (Joklik, 1972; Nibert and Fields, 1992; Virgin *et al.*, 1994). On observe également un changement de conformation de la protéine $\sigma 1$; cette dernière ayant un aspect plus allongé chez l'ISVP (Dryden *et al.*, 1993).

Les ISVPs sont converties en nucléoïdes pour se retrouver au niveau du cytoplasme. Les nucléoïdes sont dépourvues des protéines $\sigma 1$ et $\mu 1$, et sont, contrairement aux ISVPs, non infectieuses (Joklik, 1972; Smith *et al.*, 1969). Constituées principalement des protéines $\lambda 1$ et $\sigma 2$ (plus de 90%), elles représentent des unités structurales actives au point de vue transcriptionnel. De plus, les canaux formés de l'organisation des molécules $\lambda 2$ en pentamères s'évasent afin de permettre à la fois la diffusion des substrats nécessaires à la transcription des gènes viraux, et la sortie des ARN messagers (ARNm) nouvellement synthétisés (Dryden *et al.*, 1993).

2.2 Composition en acides nucléiques

La découverte de l'existence d'ARN bicaténaire a été réalisée grâce à l'observation de la présence de tels ARNs chez des cellules infectées par réovirus (Gomatos and Tamm, 1963a; Gomatos *et al.*, 1962). Une première indication attestant de la segmentation du génome de réovirus provient d'études effectuées en microscopie électronique (Gomatos and Stoeckenius, 1964; Vasquez and Kleinschmidt, 1968). Ces études ont révélé la présence de segments de taille variable (1.13-0.38 nm) et ont permis de regrouper les fragments en trois classes. Suite à la migration des ARNs

génomiques sur gel de polyacrylamide, on distingue trois fragments de grande taille représentant la classe L ('Large'), trois segments appartenant à la classe M ('Medium') et quatre courts segments de catégorie S ('Small') (figure 2). Chacun de ces segments constitue un gène et code pour une protéine virale (λ , μ , σ), à l'exception du segment S1 qui possède deux cadres de lecture qui se chevauchent pour donner soit la protéine $\sigma 1$, soit la protéine $\sigma 1NS$ (Ernst and Shatkin, 1985; Jacobs and Samuel, 1985; Sarkar *et al.*, 1985). Cette dernière représente une des trois protéines non-structurales qui aurait sans doute un rôle lors de la réplication du réovirus, les deux autres polypeptides étant σNS et μNS (pour revue: Schiff and Fields, 1990) (voir tableau).

En plus du génome viral, les réovirions renferment une sous-population d'oligonucléotides (20-30%) (Bellamy and Hole, 1970; Bellamy and Joklik, 1967; Shatkin and Sipe, 1968). Ces oligonucléotides sont libérés subséquentement à la digestion protéolytique de la capsid externe des particules virales. Bien que la fonction de ces ARNs monocaténares demeure inconnue, ils proviendraient soit d'une transcription avortée du génome viral (Bellamy *et al.*, 1972; Yamakawa *et al.*, 1982; Zarbl *et al.*, 1980a), soit d'une inactivation de la transcriptase suite à l'addition de la protéine $\sigma 3$ (Astell *et al.*, 1972). Les oligonucléotides sont regroupés en différentes classes. Il y a notamment les oligoadénylates, dont l'extrémité 3' renferme un nombre variable de molécules d'adénine (2 à 20 résidus) conséquemment à une activité partielle de la transcriptase (polymérase-oligo(A)) (Bellamy and Hole, 1970; Nichols *et al.*, 1972a; Nichols *et al.*, 1972b), et les molécules de type 5' G dont la séquence correspond à

l'extrémité 5' des ARNm des réovirus (Hastings and Millward, 1978; Nichols *et al.*, 1972a).

3. Cycle de multiplication des réovirus

3.1 Adsorption, pénétration et décapsulation des virions

Le cycle de multiplication débute avec l'adsorption des particules virales à la surface des cellules. L'attachement des virions aux récepteurs cellulaires se fait par l'intermédiaire de la portion C-terminale (domaine globulaire) de la protéine $\sigma 1$ (Duncan *et al.*, 1991; Nagata *et al.*, 1987; Yeung *et al.*, 1989). Malgré les controverses concernant l'identification des récepteurs cellulaires, plusieurs études semblent impliquer l'acide sialique (acide *N*-acétyl neuraminique) présent sur les glycoprotéines de la surface cellulaire (Paul *et al.*, 1989). Récemment, il a été démontré que les récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGFR) et l'oncogène *v-erbB*, structurellement apparenté au EGFR, augmentaient la prédisposition des cellules de souris à être infectées par les réovirions (Strong and Lee, 1996; Strong *et al.*, 1993). L'activité enzymatique intrinsèque (tyrosine kinase) des récepteurs de la classe des EGFR induirait la transduction de signaux régulant la prolifération cellulaire. Le réovirus profiterait donc de l'activation de ces kinases pour infecter les cellules.

La température influence très peu l'adsorption des virions. Ainsi, lorsque l'on infecte des cellules en culture, on procède souvent à une adsorption à 4°C afin de permettre aux particules virales de pénétrer les cellules simultanément suite à l'incubation des cellules à 37°C (Dales and Gomatos, 1965). Contrairement à l'adsorption, la pénétration est un phénomène actif dépendant de la température (32-37°C).

Suite à l'attachement de la protéine $\sigma 1$ aux récepteurs cellulaires, la portion globulaire de $\sigma 1$ subit un changement de conformation qui sera communiqué jusqu'au domaine N-terminal. Cette différence structurale observée au niveau de $\sigma 1$, provoquerait également un changement de conformation chez les autres protéines formant la capsid externe du virion (Fernandes *et al.*, 1994). Il est donc possible que ce changement structural, affectant les protéines de la capsid externe, favorise la pénétration intracellulaire des particules virales et la dissociation subséquente de la capsid externe.

L'entrée des virions se fait par endocytose, et débute par la formation de vésicules membranaires revêtues de clathrine. Cette protéine est libérée au fur et à mesure que la vésicule migre à l'intérieur du cytoplasme pour se fusionner à un lysosome. L'acidité des endolysosomes permettra alors le clivage protéolytique de la capsid externe afin de générer les particules sous-virales infectieuses (ISVPs).

La digestion *in vitro* des particules virales à l'aide de chymotrypsine permet également la formation d'ISVPs (Borsa *et al.*, 1973; Joklik, 1972). Tout comme les particules sous-virales issues de la voie endosomale, elles sont dépourvues de la protéine

$\sigma 3$ et possèdent les produits de clivage de la protéine $\mu 1C$ (ϕ et δ). Il a déjà été proposé que les réovirions et les ISVPs pénétraient la cellule en empruntant la route endosomale. Cependant, contrairement aux réovirions, les ISVPs sont capables de pénétrer directement la cellule cible. En effet, des études récentes démontrent que les ISVPs sont aptes à perméabiliser les membranes cellulaires et que leur passage intracellulaire est indépendant de l'utilisation d'inhibiteurs de la pénétration des virions (substances augmentant le pH des endosomes ou modifiant le gradient de protons) (Borsa *et al.*, 1979; Garcia-Martinez *et al.*, 1996; Lucia-Jandris *et al.*, 1993; Tosteson *et al.*, 1993).

La conversion subséquente des ISVPs en nucléoïdes active la transcriptase et les enzymes virales nécessaires à la synthèse de la structure coiffe. Ces événements conduisent à la réplication du génome viral dans le cytoplasme et marque le début de la phase précoce.

3.2 Phase précoce

La phase précoce est caractérisée par la synthèse d'ARNm avec structure coiffe à partir des ARNs bicaténaires retenus dans la capsid interne; les ARNs de polarité négative servant de matrice à la transcription du génome viral (Schonberg *et al.*, 1971; Silverstein *et al.*, 1970; Watanabe *et al.*, 1967). Ces ARNm avec structure coiffe (ou ARNm précoces) seront traduits par la machinerie traductionnelle de la cellule afin de produire des protéines virales (Zweerink and Joklik, 1970). Par la suite,

ces protéines s'associeront avec les ARNm viraux pour former la structure répliquative intermédiaire où sera synthétisé le second brin d'ARN génomique (brin négatif) (Acs *et al.*, 1971; Morgan and Zweering, 1974; Morgan and Zweerink, 1975; Sakuma and Watanabe, 1972; Schonberg *et al.*, 1971; Zweerink, 1974). Le mode de répllication du réovirus représente un des rares cas où la répllication est conservative. Le génome nouvellement répliqué est contenu dans une capsid interne pour générer les particules sous-virales filles.

Un élément important des ARNm précoces est la présence d'une structure coiffe à l'extrémité 5'. La première étape de la synthèse de la coiffe consiste à enlever le phosphate en position γ de l'extrémité 5' triphosphorylée, et cette réaction impliquerait une triphosphatase-ARN (Furuichi and Shatkin, 1977; Shatkin and Kozak, 1983). De récents résultats obtenus par notre équipe semblent justement attribuer cette activité à la protéine $\lambda 1$ (résultats non-publiés). Les enzymes nécessaires à l'obtention de la structure finale ($3'm^7G5'ppp5'G^m3'p$) sont: la guanylyltransférase, impliquée dans le transfert d'une molécule de GTP à l'extrémité 5' des ARNm, et la méthyltransférase permettant la méthylation des nucléotides G. Tel que déjà mentionné, l'activité guanylyltransférase serait portée par la protéine $\lambda 2$ (Cleveland *et al.*, 1986; Mao and Joklik, 1991).

Le rôle de la structure coiffe est de favoriser l'attachement de protéines cellulaires nécessaires à l'initiation de la synthèse protéique (facteurs d'initiation). Elle est présente chez la plupart des ARNm eucaryotes, y compris les ARNm des virus de mammifères. Par contre, cette structure est absente des ARNm des picornavirus et des

ARNm tardifs des réovirus (Zarbl *et al.*, 1980b), ces derniers étant synthétisés lors de la phase tardive du cycle de multiplication.

3.3 Phase tardive

La synthèse des ARNm tardifs résulte de la transcription des ARNs bicaténaires contenus à l'intérieur des particules sous-virales filles; on estime qu'environ 85% des ARNm viraux seraient synthétisés lors de la phase tardive (Ito and Joklik, 1972; Sakuma and Watanabe, 1971; Skup *et al.*, 1981; Zarbl *et al.*, 1980b). Au niveau de ces particules sous-virales, les enzymes intervenant dans la synthèse de la structure coiffe sont inactives, et on constate une absence de la protéine $\lambda 2$. Ces particularités expliqueraient l'absence de la structure coiffe en 5' des ARNm tardifs (Morgan and Zweering, 1974; Morgan and Zweerink, 1975; Skup and Millward, 1980a; Skup *et al.*, 1981). Ces ARNm seront ensuite traduits par la machinerie traductionnelle de la cellule. Les ARNm tardifs étant dépourvus de la structure coiffe, la stimulation de la traduction de ces ARNm s'effectuerait par l'intermédiaire d'une protéine virale, soit la protéine $\sigma 3$ (Lemieux *et al.*, 1987; Lemieux *et al.*, 1984; Zarbl and Millward, 1983).

Par la suite, les protéines virales s'associent aux particules virales filles afin de produire des particules virales matures et infectieuses (Chang and Zweerink, 1971). La transcription du génome viral s'arrête au moment de l'assemblage de la capside externe. Le processus d'assemblage des réovirions ne dépend pas nécessairement de la

présence d'ARN génomique puisse qu'il est possible d'isoler à partir de cellules infectées des particules virales ne contenant pas d'acides nucléiques ('top components') (Smith *et al.*, 1969). Le cycle de multiplication se termine par une lyse cellulaire (~24 heures post-adsorption), ce qui permet la libération des particules virales matures (le cycle de multiplication des réovirus est illustré à la figure 3).

3.4 ARNm réoviraux

Quelques éléments caractéristiques distinguent les ARNm réoviraux (ARNm précoces et tardifs): à la différence des ARNm eucaryotes, leur extrémité 3' n'est pas polyadénylée (Stoltzfus *et al.*, 1973), et on retrouve, en 5' et en 3' de chacun des dix ARNm de réovirus, des séquences nucléotidiques qui sont identiques (Antczak *et al.*, 1982; Hastings and Millward, 1981). Les séquences consensus, 5' GCUA et 3' UCAUC, pourraient être utiles lors de l'assemblage et/ou la réplication de l'ARN génomique (Hastings and Millward, 1981; Patton *et al.*, 1996; Wentz *et al.*, 1996). Bien que ces séquences n'aient jamais été impliquées dans la régulation de la traduction, elles pourraient également être responsables de la stimulation de la traduction des ARNm tardifs par $\sigma 3$.

4. Pathogénicité des réovirus

4.1 Infection naturelle

Contrairement aux rotavirus qui sont responsables du syndrome de la diarrhée et de l'entérite infantile dans les pays sous-développés, les réovirus ne sont pas associés à un grand nombre de maladies symptomatiques chez l'humain; et ce malgré le fait qu'ils aient été surtout isolés chez des patients souffrant de troubles respiratoires et intestinaux. À l'inverse des orbivirus, les réovirus ne semblent pas causer de pathologies graves chez les animaux d'élevage pouvant entraîner d'importantes pertes économiques, bien que les réovirus aviaires soient à l'origine du syndrome de malabsorption chez la volaille (Page *et al.*, 1982). Ainsi, étant donné leur faible pouvoir pathogène, les réovirus figurent surtout à titre de modèle afin d'étudier les processus d'interaction virus-cellule, et les mécanismes régulant la transcription et la traduction.

Les réovirus n'en demeurent pas moins très répandus dans l'environnement. Des études épidémiologiques effectuées dans des pays occidentaux et basées sur la détection d'anticorps anti-réovirus, démontrent que 75% de la population adulte a été exposé à ces virus (Selb and Weber, 1994). Ce n'est que dans de rares cas que les réovirus seraient associés à des problèmes respiratoires (pharyngite, rhinite), gastrointestinaux, et autres (atrésie biliaire, myocardite) (Fields, 1994).

Une étape importante de la pathogénicité des réovirus est la dissémination des particules virales au sein de l'organisme. Il est connu que la formation de syncytia contribue grandement à la propagation de virus enveloppés, tels que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Park *et al.*, 1994; Sato *et al.*, 1992). Cependant, certains virus non-enveloppés peuvent également induire cet effet cytopathique et, à venir jusqu'à maintenant, ces virus sont tous membres de la famille des Reoviridae (Gard and Compans, 1970; Gelberg *et al.*, 1990; Theil and McCloskey, 1991; Theil and Saif, 1985; Vonderfecht *et al.*, 1984; Winton *et al.*, 1987). Parmi les virus membres du genre *Orthoreovirus* (*Reovirus*) capables d'induire la formation de syncytia, figurent les réovirus aviaires, le virus de Nelson Bay (NBV) et le réovirus de babouin (BRV) (Duncan *et al.*, 1995; Wilcox and Compans, 1982; Wilcox and Compans, 1983). Ce dernier a été isolé récemment chez des primates atteints de méningoencéphalite et la caractérisation du génome de même que des protéines du BRV semble indiquer qu'il aurait divergé des réovirus aviaires et du NBV. Bien que le BRV ne soit pas clairement associé à une dégénérescence du système nerveux central, il pourrait contribuer à l'émergence d'une nouvelle pathologie virale. La propriété de former des syncytia serait donc un facteur important pour déterminer la virulence de ces virus.

Cependant, contrairement aux virus enveloppés, les mécanismes nécessaires à la fusion cellulaire (interactions protéines virales-membranes intracellulaires, modifications post-traductionnelles), ne semblent pas constituer une étape essentielle du cycle de multiplication viral. Des expériences effectuées à l'aide du réovirus aviaire

démontrent que la production de particules virales infectieuses n'est pas affectée en présence d'inhibiteurs de la glycosylation et du transport vésiculaire (Duncan *et al.*, 1996). Ainsi, la fusion cellulaire conférerait uniquement un avantage évolutif à certains réovirus, en activant le processus de propagation viral chez l'hôte infecté.

4.2 Infection chez le modèle animal

Chez les souris et les rats de laboratoire, les réovirus sont associés à plusieurs maladies (encéphalite, myocardite, hépatite, pneumonie...etc). Cependant, le type de pathologie varie suivant le mode d'inoculation et le sérotype viral utilisé.

Suite à l'ingestion de réovirions de sérotype 1 ou 3, ceux-ci sont convertis en particules sous-virales infectieuses (ISVPs) par clivage protéolytique au niveau de l'intestin. Ces particules, dépourvues de capsid externe, initient l'infection entérique en adhérant à la surface apicale des cellules M. Ces mêmes cellules assurent le transport du virus au travers l'épithélium jusqu'aux plaques de Peyer localisées dans les muqueuses sous-jacentes (Amerongen *et al.*, 1994; Nibert *et al.*, 1991; Wolf *et al.*, 1981). Par la suite, il y aura prolifération et dissémination du virus dans l'organisme soit par voie systémique, soit par voie neuronale (Sharpe and Fields, 1983). Bien que le sérotype 1 se réplique plus efficacement dans les tissus intestinaux que le sérotype 3 (Bodkin and Fields, 1989; Keroack and Fields, 1986; Rubin *et al.*, 1985), ce dernier, étant neurotrope, pourra attaquer le système nerveux central (CNS) et provoquer une

méningoencéphalite (Kauffman *et al.*, 1983b; Kaye *et al.*, 1986; Tyler *et al.*, 1989). Ainsi, subséquentement à l'inoculation de souris néo-natales par voie intracéphalique, le sérotype 3 sera beaucoup plus virulent que le sérotype 1; la dose létale 50% du virus T3D étant de 10 UFP (Unités Formatrices de Plages) comparativement à 10^7 UFP pour le virus T1L. Les souris inoculées avec le sérotype 3 développeront une encéphalite nécrosante souvent mortelle, tandis que celles inoculées avec le sérotype 1 développeront une hydrocéphalie conséquentement à une infection de l'épendyme (Tyler *et al.*, 1993; Virgin *et al.*, 1988).

La prédisposition du virus à infecter des organes distincts est déterminée par le tropisme. Au niveau du système nerveux central, le gène responsable du caractère virulent des réovirus serait le gène S1 (Weiner and Fields, 1977; Weiner *et al.*, 1980). Ce dernier code pour deux protéines: soit la protéine d'attachement cellulaire $\sigma 1$, et la protéine non-structurale $\sigma 1NS$ (Ernst and Shatkin, 1985). Il est possible que le polypeptide impliqué dans la virulence soit $\sigma 1NS$, étant donné que des études récentes démontrent que les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) reconnaissent la protéine non-structurale (Hoffman *et al.*, 1996), et que les CTLs répondent à l'infection par réovirus de façon sérotype-dépendante (Finberg *et al.*, 1979).

La réponse immunitaire (production d'anticorps par les cellules B, implication des cellules T $CD4^+$ et cytotoxiques) pourrait donc influencer la pathogénicité des réovirus en favorisant la sélection de sous-types viraux (Gombold and Ramig, 1989). Afin d'éviter la pression sélective exercée par le système immunitaire, Haller *et al.* ont choisi de déterminer les gènes viraux associés au tropisme tissulaire, en infectant des

souris SCID (Severe Combined Immunodeficiant) (Haller *et al.*, 1995b). Étant donné leur incapacité à réarranger les gènes codant pour les récepteurs cellulaires B et T, ces souris sont caractérisées par une absence d'immunité spécifique. Contrairement à ce qui a pu être observé chez les souris néo-natales, chez les souris SCID, les réovirus inoculés par voie péritonéale causent une hépatite mortelle et le sérotype 1 est plus virulent que le sérotype 3. La possibilité de réassortiment génique entre T1L et T3D a donc permis d'associer, outre le gène S1, les gènes M1, L1 et L2 ($\mu 2$, $\lambda 3$ et $\lambda 2$) au tropisme tissulaire. Ainsi, le gène S1 déterminerait non seulement la propagation du réovirus au niveau du système nerveux central mais également au niveau de l'intestin. Le gène M1 serait responsable du caractère virulent au niveau du foie, tandis que les gènes L1 et L2, étant impliqués lors de la synthèse de l'ARN viral, détermineraient le degré de virulence associé à l'ensemble des organes. Récemment, des sous-types viraux ont également pu être sélectionnés suite à l'infection de souris SCID (T3DvBr et T3DvInt). Ces sous-types furent isolés dans le cerveau et l'intestin de l'animal, et présentent par le fait même, un taux de réplication accru dans ces organes suite à l'inoculation intramusculaire de souris néo-natales (Haller *et al.*, 1995a). Il est donc possible que les sous-types T3DvBr et T3DvInt renferment des mutations au niveau des gènes S1, L1 et L2.

5. Interaction virus-cellule

5.1 Changements morphologiques

Les cellules infectées par le réovirus présentent une inclusion cytoplasmique qui renferme des acides nucléiques (ARNs bicaténaires), des polypeptides viraux et des particules virales matures et immatures (Anderson and Doane, 1966; Dales and Gomatos, 1965; Fields *et al.*, 1971; Gomatos *et al.*, 1962; McDowell *et al.*, 1972; Silverstein and Schur, 1970). Au fur et à mesure de la progression de l'infection, l'inclusion devient plus dense et se localise en périphérie du noyau. Ces inclusions sont traversées par des éléments du cytosquelette (microtubules, filaments intermédiaires), auxquels seraient associées des particules virales (Dales, 1963; Sharpe *et al.*, 1982). L'association de protéines viraux aux filaments intermédiaires pourrait avoir un rôle lors de la réplication du génome et de l'assemblage des virions (Mora *et al.*, 1987; Sharpe *et al.*, 1982; Sharpe and Fields, 1983).

5.2 Altérations du métabolisme cellulaire

Suite à une infection par réovirus, les cellules subissent une inhibition de leur synthèse en ADN, ARN et protéines. L'inhibition de la synthèse d'ADN apparaît relativement tôt lors de l'infection (8 à 10 heures post-adsorption) (Ensminger and Tamm, 1969; Ensminger and Tamm, 1970; Shaw and Cox, 1973), et se caractérise par

une condensation de la chromatine en périphérie du noyau (Chaly *et al.*, 1979). En plus de ces changements, on observe des altérations au niveau des membranes nucléaire et cytoplasmique, une vacuolisation du cytoplasme et une fragmentation endogène de l'ADN, tous des éléments typiques de l'apoptose (Tyler *et al.*, 1995). Ce dernier événement surviendrait 24 à 48 heures après l'adsorption des particules virales.

Prenant en considération que le réovirus de sérotype 3 inhibe plus efficacement la synthèse d'ADN que le sérotype 1, des études génétiques ont permis de déterminer les gènes responsables de la différence observée entre les deux sérotypes, et les gènes S1 et M2 furent identifiés (Sharpe and Fields, 1981a; Tyler *et al.*, 1996). En découvrant que les gènes S1 et M2 régissaient également l'efficacité des virus issus du réassortiment génique T3D x T1L à induire l'apoptose (Tyler *et al.*, 1995), Tyler *et al.* ont établi un lien entre l'inhibition de la synthèse d'ADN et l'apoptose. Dans un premier temps, les polypeptides générés à partir de ces gènes auraient pour fonction d'inhiber la synthèse d'ADN afin d'interrompre le cycle cellulaire, l'apoptose nécessitant souvent un arrêt du cycle en phase G₀ ou G₁ (Freeman and Estus, 1994; Meikrantz and Schlegel, 1995). Par la suite, l'arrêt de croissance de la cellule provoquerait l'apoptose. Cette hypothèse serait plausible étant donné que les protéines $\sigma 1$ et $\mu 1$, codées respectivement par les gènes S1 et M2, interviennent à une étape précoce de l'infection virale, soit lors de l'entrée des virions à l'intérieur de la cellule.

Il a déjà été proposé que l'apoptose constituait un mécanisme de défense cellulaire visant à réduire la réplication virale (Martz and Howell, 1989). Cependant, l'apoptose ne semble pas influencer la réplication des réovirus. Une étude menée avec

des cellules MDCK ('Madin-Darby canine kidney') a permis de démontrer qu'il n'y avait aucun lien entre l'apoptose et la production de particules virales infectieuses (Rodgers *et al.*, 1997). En effet, Rodgers *et al.* ont constaté que la réplication du virus T1L n'était pas diminuée chez les cellules exprimant un gène connu pour inhiber l'apoptose (Bcl-2). Les cellules MDCK ont été choisies en remplacement des cellules L929, car chez ces cellules, le rendement du virus T1L est plus élevé que celui du virus T3D. Ces résultats sont donc en accord avec le principe voulant que l'inhibition de la synthèse d'ADN, ou l'induction de l'apoptose, soit indépendante de la réplication virale (Gaulton and Greene, 1989; Sharpe and Fields, 1981a; Shaw and Cox, 1973; Tyler *et al.*, 1995).

Le degré d'inhibition de la synthèse d'ARN de même que le niveau d'inhibition de la synthèse des protéines cellulaires dépendent également du sérotype viral (Gomatos and Tamm, 1963b; Kudo and Graham, 1966; Sharpe and Fields, 1982). Il a été démontré que le virus de sérotype 2 (T2J) inhibait plus efficacement la synthèse protéique que les sérotypes 1 et 3, et que le degré d'inhibition de la synthèse d'ARN était comparable à celui observé pour la synthèse protéique (Sharpe and Fields, 1982). La possibilité de réassortiment génique entre les virus T2J et T3D a donc permis d'attribuer l'efficacité d'inhibition de la synthèse protéique au gène S4. Le rôle de la protéine σ_3 dans la régulation de la synthèse protéique sera présenté dans la section traitant de la relation entre la structure et la fonction de la protéine σ_3 .

Suite à l'infection des cellules L929 par le virus T3D, on note une inhibition graduelle de la synthèse des protéines cellulaires (Detjen *et al.*, 1982; Munemitsu and Samuel, 1984; Munoz *et al.*, 1985; Zweerink and Joklik, 1970). Le mécanisme

emprunté par le réovirus pour inhiber la synthèse des protéines cellulaires, favoriserait également la synthèse de protéines virales nécessaires à la multiplication du virus. Cette transition de la synthèse des protéines cellulaires vers la synthèse des protéines virales serait attribuable à des modifications affectant la machinerie traductionnelle de la cellule (voir plus loin). Bien qu'il semble y avoir une corrélation entre l'inhibition de la synthèse des protéines cellulaires, la production de particules virales et la mortalité cellulaire, l'intensité de ces phénomènes varie suivant le type cellulaire (Lemay and Danis, 1993; Munemitsu and Samuel, 1984). Ainsi, les lignées cellulaires présentant un faible taux de mortalité sont plus résistantes à l'inhibition de la synthèse des protéines cellulaires et démontrent une diminution de leur rendement viral (Lemay and Danis, 1993). La résistance à l'inhibition de la synthèse des protéines cellulaires serait en partie responsable de l'efficacité à établir la persistance virale chez ces lignées.

5.3 Établissement d'infections persistantes

Les réovirus peuvent produire des infections persistantes chez un grand nombre de lignées cellulaires en culture; notamment chez les fibroblastes embryonnaires humains (Bell and Ross, 1966), les cellules CHO ('Chinese Hamster Ovary cells') (Taber *et al.*, 1976), et les cellules L929 de souris (Ahmed *et al.*, 1981a; Ahmed and Graham, 1977). L'établissement d'infections persistantes est réalisable suite au passage de souches virales à haute multiplicité d'infection (MOI). Lorsque les souches virales sont propagées dans ces conditions, il y a génération de virus défectifs

et mutants (mutants de délétion et thermosensibles (ts)) (Ahmed *et al.*, 1980a; Ahmed *et al.*, 1980b; Ahmed and Graham, 1977; Nonoyama *et al.*, 1970; Schuerch and Joklik, 1972) qui réduisent le rendement viral. D'autres mécanismes semblent également atténuer l'apparition d'effets cytopathiques: l'inefficacité du processus de décapsidation virale chez les cellules L929 traitées au chlorure d'ammonium (Canning and Fields, 1983), l'incapacité intrinsèque de convertir les virions en ISVPs chez les cellules MEL ('Murine Erythroleukemia Cells') (Wetzel *et al.*, 1997a) et, tel que mentionné précédemment, la résistance à l'inhibition de la synthèse des protéines cellulaires suite à l'infection des cellules SC1 par réovirus (Danis *et al.*, 1993a).

La persistance virale serait maintenue dans les cellules en culture grâce à une transmission horizontale des virions (Matsuzaki *et al.*, 1986), car il est possible de remédier à l'infection persistante en traitant ces cellules avec des anticorps anti-réovirus (Ahmed *et al.*, 1981a; Danis *et al.*, submitted-b; Dermody *et al.*, 1995; Dermody *et al.*, 1993; Taber *et al.*, 1976). Lors du maintien de la persistance virale, on sélectionne des cellules démontrant une résistance accrue à la multiplication virale. La sélection de virus mutants capables d'infecter des cellules de plus en plus résistantes à la multiplication virale, favorise la co-évolution de cellules et de virus mutants.

Il a été démontré que les réovirus provenant de cellules infectées de façon persistante (virus PI) se multipliaient plus efficacement que les réovirus de type sauvage dans des cellules traitées au chlorure d'ammonium (Dermody *et al.*, 1993; Wetzel *et al.*, 1997a; Wetzel *et al.*, 1997b); subséquemment à la pénétration des virions à l'intérieur de la cellule, ce composé inhiberait la digestion de la capside

externe en augmentant le pH intralysosomal. De plus, les cellules rétablies d'une infection persistante suite au traitement antiviral, permettent la multiplication des virus PI et des ISVPs (particules sans capsid externe), préférentiellement au virus de type sauvage (Ahmed *et al.*, 1981b; Danis *et al.*, submitted-b; Dermody *et al.*, 1993; Kauffman *et al.*, 1983a; Wetzel *et al.*, 1997a). Dernièrement, l'efficacité des virus PI à croître dans des cellules rétablies d'une infection persistante a été attribué aux gènes S1 et S4, codant respectivement pour les protéines $\sigma 1$ et $\sigma 3$ (Kauffman *et al.*, 1983a; Wilson *et al.*, 1996). Cette association soutiendrait les premières hypothèses voulant que ces gènes soient impliqués dans l'établissement et le maintien d'infections persistantes (Ahmed and Fields, 1982; Sharpe and Fields, 1983). Il a été démontré que la protéine $\sigma 1$ des virus PI renferme des mutations affectant sa capacité à former des oligomères (Wilson *et al.*, 1996), et que la protéine $\sigma 3$ est clivée plus rapidement par les protéases que la protéine provenant du virus de type sauvage (Wetzel *et al.*, 1997b). Ces observations témoignent donc de l'importance de la stabilité de la capsid externe dans le maintien d'infections persistantes.

5.4 Production d'interféron

Suite à l'infection des cellules avec le réovirus, celles-ci produisent de l'interféron (revu dans: Schiff and Fields, 1990). Les interférons (IFNs) furent découverts grâce à leur mécanisme antiviral, d'où leur nom 'interférons' car ils interfèrent avec la réplication des virus (Isaacs and Lindenmann, 1957). Ils regroupent

une multitude de polypeptides, lesquels sont codés par trois familles de gènes. Ainsi, on distingue trois classes d'interférons: soit l'IFN- α , produit principalement par les leucocytes, l'IFN- β , synthétisé par les fibroblastes, et l'IFN- γ , produit suite à une stimulation des lymphocytes.

Les interférons sont à l'origine d'une variété d'effets biologiques: ils agissent sur la croissance et la différenciation cellulaire, influencent la réponse immunitaire et empêchent la multiplication virale. Les IFNs - α et - β , ou interférons de type I, sont surtout synthétisés en réponse à une infection virale, tandis que l'IFN- γ représente l'interféron de type II (dit interféron immun), et est produit en réponse à des antigènes ou des agents mutagènes.

Le mécanisme antiviral de l'interféron a été grandement étudié (pour revue: Samuel, 1991). Il semble que l'effet protecteur de l'interféron dépende de la multiplicité d'infection. En effet, de fortes concentrations d'interféron protège contre de faibles multiplicités d'infection, tandis qu'en présence de multiplicités élevées, l'efficacité de l'interféron à contrecarrer l'infection virale diminue. De plus, il est maintenant admis que l'interféron en soi n'est pas responsable de l'effet antiviral, mais que différents facteurs antiviraux sont induits en réponse à l'interféron. Parmi les protéines cellulaires dont la transcription génique est induite suite à une stimulation de l'interféron, on retrouve les protéines Mx, l'enzyme 2'-5' adénylate synthétase et la protéine kinase ARN-dépendante.

Le mécanisme d'action de l'interféron peut se résumer comme suit. L'interféron se lie spécifiquement à son récepteur cellulaire, et cette interaction active

une protéine kinase chargée de transmettre des signaux intracellulaires afin d'augmenter le niveau de transcription de gènes cellulaires. Un de ces signaux impliquerait la migration d'un facteur de transcription vers le noyau. Le facteur ISGF-3 (IFN-stimulated gene factor) représente un des trois complexes protéiques capable de lier les gènes possédant en 5' une séquence ISRE (INF-Stimulated Response Element), et constituerait le principal facteur activé suite à l'attachement des IFN- α/β aux récepteurs cellulaires (Dale *et al.*, 1989). La forme active de l'ISGF-3 nécessite la présence de deux sous-unités fonctionnelles, soit l'ISGF3- α et l'ISGF-3 γ . Ce n'est qu'une fois activée, que l'ISGF- α sera transporté au noyau en association avec la sous-unité ISGF-3 γ (Fu *et al.*, 1990). Suivant le virus et le type cellulaire utilisés, les protéines induites sous l'action de l'interféron peuvent intervenir à différentes étapes de la multiplication virale (transcription, traduction et assemblage des virions).

Bien que son mécanisme d'action demeure inconnu, la protéine Mx1 inhiberait, suite à la production d'interférons de type I, la transcription du virus influenza chez les cellules de souris (Krug *et al.*, 1985; Staeheli and Haller, 1987). Quant à l'enzyme 2'-5'-synthétase, elle permet la formation d'oligonucléotides, reliés entre eux par des liaisons 2'-5'. Ces derniers activeraient une ribonucléase (endoribonucléase L) responsable de la dégradation d'ARNm viraux et cellulaires (Baglioni *et al.*, 1978; Clemens and Williams, 1978). Il a été démontré que l'expression de la synthétase de façon constitutive chez des cellules inhibait la multiplication des picornavirus, dont EMCV ('encephalomyocarditis virus') (Chebath *et al.*, 1987). Finalement, l'induction de la protéine kinase ARN-dépendante (PKR) par l'interféron entraînerait l'inhibition

de la synthèse des protéines virales et cellulaires. Étant donné que cette protéine est responsable de l'effet antiviral observé subséquent à l'infection des cellules par réovirus (Miyamoto and Samuel, 1980), son mode d'action sera expliqué plus en détail dans la section suivante.

6. Rôles de la protéine kinase ARN-dépendante (PKR)

6.1 Structure de la PKR

La PKR est une sérine/thréonine protéine kinase de 65-68 kDa, selon l'espèce, dont l'activation nécessite la présence d'ARNs bicaténaires ou d'ARNs renfermant une structure secondaire importante (Galabru and Hovanessian, 1987; Krust *et al.*, 1984; Meurs *et al.*, 1990). Suite à son activation, elle s'autophosphoryle grâce à des phosphorylations intermoléculaires (Kostura and Mathews, 1989; Ortega *et al.*, 1996; Thomis and Samuel, 1995) et possiblement intramoléculaires (Berry *et al.*, 1985; Galabru *et al.*, 1989) pour ensuite catalyser la phosphorylation de divers substrats (Jacobs and Imani, 1988; Kumar *et al.*, 1994; Levin and London, 1978; Samuel, 1979). Ces événements auront pour conséquence soit d'interrompre le processus d'initiation de la synthèse protéique, soit d'influencer la prolifération cellulaire. La PKR est également connue sous le nom de DAI, dsI et p68 (ou p65) kinase.

Le site de liaison à l'ARN englobe les 170 premiers acides aminés de l'extrémité amino-terminale (Patel and Sen, 1992), et comprend deux domaines riches

en acides aminés basiques. La présence de deux motifs basiques est souvent observée chez les protéines ayant de l'affinité pour l'ARN bicaténaire (McCormack *et al.*, 1992; St. Johnston *et al.*, 1992). Le premier motif de la PKR est localisé entre les acides aminés 55 et 75 (RI), tandis que le deuxième est situé entre les acides aminés 145 et 166 (RII) (Chong *et al.*, 1992; McCormack *et al.*, 1992). Contrairement au motif RII, le motif RI serait essentiel à l'attachement de l'ARN (Green and Mathews, 1992). En effet, des expériences visant à dupliquer le premier motif démontrent une augmentation de l'affinité de la kinase pour l'ARN bicaténaire alors que la duplication du deuxième motif, en absence de RI, est insuffisante à l'attachement de la protéine à l'ARN bicaténaire. Des expériences de mutagenèse dirigée ont également permis de démontrer l'importance de certains acides aminés situés au niveau du premier motif de liaison à l'ARN, notamment la glycine en position 57 et la lysine en position 60 (McMillan *et al.*, 1995)

D'autre part, l'extrémité carboxy-terminale renferme plusieurs domaines propres aux sérine/thréonine kinases, soit un motif de liaison à l'ATP (Gly-X-Gly-X-X-Gly), un motif de type Asp-Leu-Lys-Pro-Ser-Asn et un domaine riche en sérines et thréonines. L'ensemble de ces domaines serait responsable de l'activité catalytique de l'enzyme (Meurs *et al.*, 1990). La structure de la PKR est illustrée à la figure 4.

6.2 Activation de la PKR

La PKR est activée par de faibles concentrations d'ARN bicaténaire (0.01-1 µg/ml), et inhibée lorsque la concentration en ARN est trop élevée (Galabru and Hovanessian, 1987). Ce phénomène serait attribuable à la présence de sites d'attachement dont le degré d'affinité pour l'ARN est variable. Il a été proposé que le site de liaison de haute affinité serait responsable de l'activation de la kinase, tandis que celui de faible affinité serait impliqué lors de son inhibition (Galabru *et al.*, 1989). L'interaction de PKR avec l'ATP, et son autophosphorylation subséquente, dépendraient de la présence d'ARN bicaténaire et de magnésium (Galabru and Hovanessian, 1987). Ainsi, la portion N-terminale de la PKR n'a pas seulement un rôle dans l'attachement de l'ARN, mais également dans la régulation de l'activation enzymatique. Le niveau d'activation de la PKR peut également être influencé par la libération du Ca⁺² séquestré à l'intérieur du réticulum endoplasmique (Prostko *et al.*, 1995). Une telle mobilisation du Ca⁺² nuirait au repliement de protéines nouvellement synthétisées et à la réalisation de modifications post-traductionnelles. Ces altérations commanderaient alors un arrêt du processus d'initiation de la traduction par l'intermédiaire de la PKR.

Le type d'ARN bicaténaire pouvant activer la PKR peut être d'origine synthétique (poly(I).poly(C)) ou naturelle (ARN viral). Des études récentes ont permis d'identifier une séquence contenue à l'intérieur de l'ARNm du segment S1 de réovirus qui pouvait fortement activer la PKR (Henry *et al.*, 1994). Cette région de 160 pb

(paires de bases) a le potentiel d'adopter une importante structure secondaire renfermant un domaine bicaténaire. Il a également été démontré que certaines molécules polyanioniques, telles que l'héparine, peuvent également permettre l'autophosphorylation de PKR et la phosphorylation du facteur d'initiation eIF-2 α (George *et al.*, 1996; Hovanessian and Galabru, 1987; Patel *et al.*, 1994). Cependant, la PKR activée par l'héparine ne peut catalyser la phosphorylation intermoléculaire d'une PKR dépourvue d'activité catalytique (His-PKR(K296R)) (George *et al.*, 1996). De plus, le site démontrant de l'affinité pour l'héparine ne semble pas être le même que celui liant l'ARN, car un mutant de la PKR (PKR(K64E), connu pour son incapacité à fixer l'ARN, peut lier l'héparine conjuguée à des billes d'agarose (George *et al.*, 1996). Ainsi, il est possible que le mécanisme d'activation de la PKR par l'héparine conduise à des événements autres que l'inhibition de la multiplication virale.

Finalement, la phosphorylation de la PKR peut être induite artificiellement suite à la transfection d'un ADN plasmidique dans des cellules de mammifères. Subséquemment à une transfection, la transcription des deux brins d'ADN entraîne une production d'ARN bicaténaire qui active la PKR et diminue l'efficacité de la traduction des ARNs correspondant aux plasmides transfectés (Kaufman and Murtha, 1987).

6.3 Conséquences de l'activation de la PKR

Tel que déjà mentionné, subséquemment à l'activation de la PKR, cette dernière peut catalyser la phosphorylation d'une variété de substrats. Parmi ces substrats on retrouve les histones (Jacobs and Imani, 1988), l'inhibiteur du facteur de transcription NF κ B (I κ B) (Kumar *et al.*, 1994), et l'eIF-2 α (eukaryotic initiation factor-2 α) (Samuel, 1979). Les effets de la phosphorylation de l'eIF-2 par la PKR sont bien connus et seraient à l'origine du processus d'inhibition de la multiplication de nombreux virus (figure 5). Cette phosphorylation se fait au niveau de la sérine en position 51 de la sous-unité α (Lasky *et al.*, 1982) (figure 5). En plus de la sous-unité α , le facteur d'initiation eIF-2 possède deux autres sous-unités, soit β et γ .

En temps normal, la synthèse des protéines est initiée par la formation d'un complexe composé de l'ARN de transfert (ARNt), portant la méthionine initiale (i), et de la sous-unité ribosomale 40S (40S.Met-tRNA_i). La formation de ce premier complexe est catalysée par le facteur d'initiation eIF-2, qui lie la Met-tRNA_i par l'intermédiaire de sa sous-unité γ . Par la suite, l'ARNm vient s'associer à ce complexe par l'intermédiaire de protéines ayant pour fonction de lier la coiffe en 5' des ARNm ('cap binding proteins': eIF-4G et autres composants du complexe eIF-4) (pour revue: Clemens, 1994; Lewin, 1990). Pour qu'il y ait rapprochement entre la sous-unité 40S et l'ARNt portant la méthionine initiale, ce dernier doit se joindre au facteur d'initiation eIF-2 et au GTP (aussi appelé complexe ternaire), la présence de GTP étant nécessaire à l'activation du eIF-2 (figure 6). Le GTP demeure lié à la sous-unité

α du eIF-2 jusqu'à l'association de la sous-unité ribosomale 60S, moment où le GTP est hydrolysé en GDP. Pour que s'effectuent les cycles subséquents d'initiation de la synthèse protéique, le GDP devra être substitué par une nouvelle molécule de GTP. Ce processus d'échange nécessite une interaction entre l'eIF-2 α et un deuxième facteur d'initiation, soit le GEF ('Guanine Exchange Factor') (voir figure 7).

Suite à la phosphorylation d'eIF-2 α , l'affinité de ce dernier pour le facteur GEF se trouve à être augmentée, ce qui entraîne la séquestration du GEF dans un complexe inactif (eIF-2.GDP.GEF). Ces événements empêchent le déroulement de la réaction d'échange GDP/GTP et interfèrent avec le processus d'initiation de la synthèse protéique.

En plus de son rôle dans la régulation de la synthèse protéique des cellules infectées (Samuel, 1991), la PKR intervient au niveau de la croissance et de la prolifération cellulaire (Meurs *et al.*, 1993). En effet, conséquemment à l'expression de la PKR humaine dans les levures, on note une augmentation du degré de phosphorylation du facteur d'initiation eIF-2 α et une diminution de la prolifération cellulaire (Chong *et al.*, 1992). En contrepartie, lorsque l'on exprime des mutants non-fonctionnels de la PKR chez des cellules de souris NIH 3T3, celles-ci deviennent transformées et induisent des tumeurs suite à leur injection dans des souris nues ('nude') (Koromilas *et al.*, 1992; Meurs *et al.*, 1993). Le groupe de M. G. Katze a constaté que l'expression, chez des cellules NIH 3T3, d'une PKR mutée au niveau du domaine de liaison à l'ARN (RI) pouvait également contribuer à la production de

cellules tumorales (Barber *et al.*, 1995b). L'ensemble de ces résultats suggère que la PKR agit à titre d'onco-supresseur.

Dernièrement, Barber *et al.* ont observé que les mutants du domaine catalytique (PKR-M1) et du site de liaison à l'ARN (PKR-M7) avaient un effet dominant sur l'inhibition d'une PKR de type sauvage, lorsque soumis à des tests enzymatiques *in vitro* (Barber *et al.*, 1995a). Cependant, le mécanisme à l'origine de l'effet transdominateur semble varier pour ces deux mutants. Alors que la PKR-M1 empêche l'activation de la PKR de type sauvage (PKR-WT) en séquestrant l'ARN bicaténaire, la PKR-M7 inhibe l'activation de la PKR-WT en interagissant directement avec celle-ci. Étant donné que les niveaux de phosphorylation du facteur eIF-2 α sont plus faibles dans les cellules exprimant la PKR-M7 que dans les cellules exprimant la PKR-M1, le mutant PKR-M1 pourrait provoquer la transformation cellulaire par un processus indépendant du rôle traductionnel de la PKR. Il est connu que la PKR peut également intervenir au niveau de la transduction de signaux intracellulaires, et au niveau de l'activité transcriptionnelle de la cellule par l'intermédiaire de NF- κ B (Kumar *et al.*, 1994).

6.4 Régulation de la PKR par les virus

Étant donné l'efficacité de la PKR à inhiber la multiplication virale, plusieurs virus ont développé, au cours de leur évolution, des stratégies visant soit à empêcher

son activation, soit à limiter son effet sur la synthèse protéique (pour revue: Katze, 1992). La figure 8 résume des stratégies empruntées par différents virus.

Une première stratégie, adoptée par l'adénovirus et le virus Epstein-Barr, consiste en la production d'ARN viral pouvant compétitionner avec l'ARN bicaténaire pour le domaine de liaison à l'ARN de la PKR. Bien que ces courtes molécules puissent lier la PKR, elles n'entraînent toutefois pas l'activation de l'enzyme. En ce qui concerne les adénovirus, ces courts ARNs sont synthétisés tardivement lors de l'infection par l'ARN polymérase cellulaire III, et sont connus sous le nom de 'VA RNAs' (Virus Associated RNAs) (Mathews and Peterson, 1978; Mathews and Shenk, 1991). Subséquemment à l'infection des cellules par un adénovirus (dl331) dont le gène VA I a subi une délétion, on observe une faible multiplication virale et une sensibilité accrue du virus à l'effet antiviral de l'interféron (Kitajewski *et al.*, 1986; Thimmappaya *et al.*, 1982). Ces phénomènes seraient attribuables à une inhibition de la synthèse protéique suite à l'activation de la PKR. Chez les virus herpès, on retrouve également de courts ARNs, mais ces derniers sont appelés EBER-1 et EBER-2 (EBV Encoded RNAs) (Bhat and Thimmappaya, 1983). Tout comme les VA RNAs, ils possèdent une structure secondaire importante leur permettant de bloquer l'activation de la PKR (Clarke *et al.*, 1991; Clemens *et al.*, 1994; Sharp *et al.*, 1993). Ces EBERs peuvent également compléter fonctionnellement les adénovirus défectifs au niveau du gène VA I (Bhat and Thimmappaya, 1983).

Certains virus, tels que le virus influenza, induisent l'expression d'un facteur cellulaire (p58 ou p58IPK) pouvant inhiber la PKR. Cette protéine cellulaire, de 58

kDa, inhiberait l'autophosphorylation de la PKR et la phosphorylation du facteur eIF-2 α suite à une interaction directe entre la PKR (Lee *et al.*, 1990). La région de la PKR responsable de cette interaction a été identifiée, et correspond au site de liaison à l'ATP situé au niveau du domaine catalytique de l'enzyme (Gale *et al.*, 1996). La p58 est membre de la famille des tétratricopeptides, lesquels seraient impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. En effet, une sur-expression de cette protéine provoque la transformation de cellules en culture en bloquant l'activation de la PKR endogène (Barber *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1994). Bien que le mécanisme d'action ne soit pas entièrement connu, il semble que la protéine p58 se dissocie d'un anti-inhibiteur avant d'entraîner l'inactivation de la PKR (Lee *et al.*, 1990). Dernièrement, Melville *et al.* ont identifié une molécule chaperone pouvant contrôler l'activation de la p58IPK. Cette molécule joue un rôle important en réponse au stress et fait partie de la famille des protéines de choc thermique (heat shock protein 40) (Melville *et al.*, 1997). Le virus influenza interagirait donc avec des facteurs cellulaires impliqués dans la réponse au stress.

Une dernière stratégie vise à séquestrer l'ARN bicaténaire, activateur de la PKR. Parmi les protéines virales ayant de l'affinité pour l'ARN bicaténaire et capables d'inhiber l'activation de la PKR, on retrouve la protéine p25 du virus de la vaccine (VV) et la protéine $\sigma 3$ de réovirus. La p25 est codée par le gène E3L et est produite lors de la phase précoce du cycle de multiplication viral (Whitaker-Dowling and Youngner, 1984), et l'affinité de cette protéine pour l'ARN bicaténaire est due à la présence d'un domaine de liaison à l'ARN (Chang and Jacobs, 1993). La capacité des

mutants générée au niveau du gène E3L à induire la multiplication d'un virus défectif pour E3L (VV E3L-), est associée à leur efficacité à lier l'ARN bicaténaire (Chang *et al.*, 1995). Cependant, la grande résistance du virus de la vaccine à l'effet antiviral de l'interféron n'est pas seulement due au produit du gène E3L, mais également au polypeptide généré à partir du gène K3L (Beattie *et al.*, 1995b; Beattie *et al.*, 1991). Ce polypeptide possède une homologie partielle avec le facteur d'initiation eIF-2 α et agirait à titre de pseudosubstrat pour la PKR afin d'empêcher la phosphorylation de ce facteur (Beattie *et al.*, 1991; Carroll *et al.*, 1993; Davies *et al.*, 1992). Finalement, la protéine $\sigma 3$ de réovirus assure également une protection contre l'effet antiviral de l'interféron en liant l'ARN activateur de la PKR. Le mécanisme d'action de la protéine $\sigma 3$ sera traitée de façon plus détaillée dans la section suivante.

7. Relation entre la structure et la fonction de la protéine $\sigma 3$ de réovirus

7.1 Structure de la protéine $\sigma 3$

La protéine $\sigma 3$ de réovirus représente une des protéines majeures de la capsid externe du réovirion. Elle est retrouvée en association avec un produit de clivage ($\mu 1C$) de la protéine $\mu 1$, lequel serait généré lors de l'assemblage des virions (pour revue: (Schiff and Fields, 1990). Des études stoechiométrique semblent indiquer que le virion contiendrait les protéines $\sigma 3$ et $\mu 1C$ en égales proportions moléculaires; le

réovirion comporterait ainsi 600 molécules des complexes σ_3 - μ_1 C (Metcalf *et al.*, 1991).

La protéine σ_3 , constituée de 365 acides aminés (41 kDa), est codée par le gène S4. Le gène S4 appartenant aux trois sérotypes de réovirus de mammifères, de même que celui provenant de nombreux isolats viraux, fut cloné et exprimé dans un grand nombre de systèmes d'expression employant aussi bien les cellules procaryotes que les cellules eucaryotes (Giantini *et al.*, 1984; Kedl *et al.*, 1995; Seliger *et al.*, 1992). L'analyse de la séquence en acides aminés de la protéine σ_3 révèle la présence de plusieurs sites de clivage potentiellement accessibles aux protéases, telles que la chymotrypsine (Joklik, 1972). Cependant, lorsque la protéine est exposée à ces enzymes pour une courte durée, ces sites de clivages ne sont pas tous utilisés. Une brève digestion à l'aide de la protéase V8 (protéase du *Staphylococcus aureus*) génère deux fragments caractéristiques qui correspondent aux régions amino- (24 kDa) et carboxy- (16 kDa) terminales de la protéine (Miller and Samuel, 1992; Schiff *et al.*, 1988; Wang *et al.*, 1996). Des observations effectuées en microscopie cryo-électronique de la protéine σ_3 révèlent également la présence de deux domaines globulaires reliés entre eux par une structure charnière (Dryden *et al.*, 1993). Ainsi, il est possible que le site de clivage attaqué par la protéase soit situé au niveau de la structure charnière de la protéine. De plus, les deux fragments générés suite à la digestion protéolytique correspondent à des domaines fonctionnels de la protéine σ_3 . Tel que déterminé par des essais sur filtre, le domaine amino-terminal possède un site

d'attachement au zinc tandis que le domaine carboxy-terminal possède un site de liaison à l'ARN bicaténaire (Schiff *et al.*, 1988).

7.2 Région amino-terminale

La région amino-terminale de la protéine $\sigma 3$ renferme des séquences pouvant adopter une forme en doigt de gant, d'où le nom de 'doigt de zinc'. Cette structure est stabilisée grâce à une liaison avec le Zn^{++} . Les protéines à doigt de zinc ont été décrites pour la première fois avec la protéine TFIIIA, un facteur de transcription qui intervient dans la synthèse de l'ARN ribosomal 5S. Suite à des études de spectroscopie d'absorption, Schiff *et al.* ont démontré que la portion amino-terminale de $\sigma 3$ pouvait lier un atome de zinc (Schiff *et al.*, 1988). Normalement, les liaisons de coordination avec le zinc se font par l'intermédiaire de quatre acides aminés situés à la base du doigt. Ces acides aminés sont des cystéines et/ou des histidines. Des expériences de mutagenèse dirigée effectuées dans notre laboratoire ont permis d'établir que le motif de liaison au zinc de la protéine $\sigma 3$ était de type Cys-X₂-Cys-X₁₂-His-X₅-Cys (Mabrouk and Lemay, 1994a). Initialement, il avait été proposé que ce motif était de type Cys-X₂-Cys-X₁₂-His-X₃-His, lequel motif se rapprochait davantage de celui identifié pour la protéine TFIIIA (Hanas *et al.*, 1983; Schiff *et al.*, 1988).

Le rôle exact du motif à doigt de zinc de la protéine $\sigma 3$ demeure inconnu. Cependant, il a été démontré que la stabilité de la protéine était associée à sa capacité de lier un atome de zinc; les protéines mutées au niveau du motif de liaison au zinc

sont instables lorsqu'exprimées de façon transitoire chez les cellules COS (Mabrouk and Lemay, 1994a), et présentent une sensibilité accrue aux protéases lorsqu'exprimées à l'aide d'un système de traduction *in vitro* (Shepard *et al.*, 1995). Ainsi, la tétracoordination d'un atome de zinc serait nécessaire pour que la protéine adopte une conformation lui permettant de résister aux protéases cellulaires (Mabrouk and Lemay, 1994a; Shepard *et al.*, 1996). Le motif à doigt de zinc serait également impliqué lors d'interactions protéine-protéine. En effet, des protéines σ_3 recombinantes comportant des mutations au niveau du doigt de zinc sont incapables d'interagir avec la protéine μ_1 de la capsid externe (Mabrouk and Lemay, 1994b; Shepard *et al.*, 1996).

Les acides aminés impliqués lors de l'association de σ_3 avec μ_1 n'échangent pas tous des liaisons de coordination avec le zinc. En effet, la caractérisation d'un réovirus thermosensible (ts453), déficient pour l'assemblage de sa capsid externe, a permis d'identifier un acide aminé (asparagine en position 16) à l'extérieur du motif de liaison au zinc de la protéine σ_3 , mais tout de même important dans l'interaction σ_3 - μ_1 (Danis *et al.*, 1992). Tel que démontré par des études de co-transfection à l'aide de vecteurs d'expression codant pour σ_3 et μ_1 , une étroite association entre σ_3 et μ_1 est nécessaire au clivage subséquent de μ_1 en μ_1C (Mabrouk and Lemay, 1994b; Tillotson and Shatkin, 1992).

La portion amino-terminale de σ_3 présente une analogie de séquence avec certaines protéases virales (Schiff *et al.*, 1988). Cette séquence, de type Cys-Gly-Gly- X_3 -Cys-X-His, est retrouvée chez la protéase 2A des poliovirus, rhinovirus et

coxsachievirus (Picornaviridae) (Callahan *et al.*, 1985; Iizuka *et al.*, 1987; Toyoda *et al.*, 1984). De plus, elle est conservée chez la protéine $\sigma 3$ des trois sérotypes de réovirus (Atwater *et al.*, 1986; Giantini *et al.*, 1984; Seliger *et al.*, 1992). Chez les picornavirus, cette séquence confère l'activité catalytique responsable du clivage protéolytique de la polyprotéine virale P1, générant ainsi les protéines de la capsid (Bazan and Fletterick, 1988; Toyoda *et al.*, 1986). Cependant, le rôle de la séquence 'protéolytique' de $\sigma 3$ n'est toujours pas élucidé. Des travaux utilisant la mutagenèse dirigée excluent la possibilité que cette séquence ait un rôle dans le clivage de $\mu 1$ en $\mu 1C$ (Mabrouk and Lemay, 1994b). Bien que le clivage de $\mu 1$ soit dépendant d'une association entre $\sigma 3$ et $\mu 1$, ce processus pourrait nécessiter l'action d'une protéase cellulaire. L'importance de la myristylation de $\mu 1$ suggère plutôt que son clivage surviendrait suite à une interaction avec les membranes des compartiments cellulaires (Tillotson and Shatkin, 1992). Étant donné que la protéine $\sigma 3$ est impliquée dans l'inhibition de la synthèse protéique de la cellule hôte, il est possible que la séquence 'protéolytique' soit responsable de la dégradation d'un facteur d'initiation de la traduction, tels que l'eIF-4G (Sonenberg *et al.*, 1981; Zarbl and Millward, 1983); un tel processus ayant déjà été proposé pour d'autres virus (Borman *et al.*, 1997; Hentze, 1997; Kozak, 1986; Schneider and Shenk, 1987; Sonenberg, 1987).

7.3 Région carboxy-terminale

Le domaine carboxy-terminal de la protéine $\sigma 3$ confère à la protéine sa capacité de lier l'ARN bicaténaire (Schiff *et al.*, 1988); cette propriété de $\sigma 3$ ayant été démontrée pour la première fois par les travaux de Huismans *et al.* (Huismans and Joklik, 1976). De plus, l'affinité de la protéine pour les acides nucléiques est restreinte à l'ARN bicaténaire, $\sigma 3$ étant incapable de lier l'ARN monocaténaire ou l'ADN bicaténaire (Huismans and Joklik, 1976). Cependant, cette affinité est non-spécifique car la protéine lie aussi bien l'ARN bicaténaire d'origine synthétique (poly(rI).poly(rC) cellulose, ARN bicaténaire synthétisé *in vitro*) que l'ARN bicaténaire d'origine naturelle (ARN de réovirus) (Huismans and Joklik, 1976; Schiff *et al.*, 1988; Wang *et al.*, 1996).

Les techniques permettant de générer des mutants de délétion, et les expériences de mutagenèse dirigée ont aidé à mieux délimiter la région responsable de l'attachement à l'ARN bicaténaire (Denzler and Jacobs, 1994; Mabrouk *et al.*, 1995; Miller and Samuel, 1992; Wang *et al.*, 1996). Cette région est comprise entre les résidus 221 et 305 (région d'environ 85 a.a.) et renferme deux copies d'un motif riche en acides aminés basiques; le premier motif englobe les résidus 233 à 240, et le deuxième, les résidus 291 à 298 (Miller and Samuel, 1992). Bien que le domaine de liaison à l'ARN de la protéine $\sigma 3$ soit conservé parmi les trois sérotypes de réovirus (Seliger *et al.*, 1992), il présente très peu d'homologie avec d'autres protéines virales ou cellulaires également connues pour fixer l'ARN bicaténaire (PKR humaine,

protéine NS34 de rotavirus, protéine p25 du virus de la vaccine...etc.) (Both *et al.*, 1984; Galabru and Hovanessian, 1987; Watson *et al.*, 1991). Des études récentes démontrent que le deuxième motif carboxy-terminal serait plus important que le premier dans l'interaction de la protéine avec l'ARN bicaténaire (Wang *et al.*, 1996). En effet, suite à la digestion de la protéine $\sigma 3$ à l'aide de la protéase V8 afin d'éliminer le domaine amino-terminal, la présence du deuxième motif est suffisante pour assurer une liaison avec l'ARN bicaténaire. Les essais sur filtre employant la protéine $\sigma 3$ pleine longueur et tronquée suggèrent également que la région amino-terminale n'est pas essentielle à l'attachement à l'ARN bicaténaire et que l'affinité de la protéine pour l'ARN est augmentée suite à l'élimination du domaine amino-terminal (Schiff *et al.*, 1988; Wang *et al.*, 1996). Étant donné que les deux motifs sont nécessaires à l'attachement de la protéine non-tronquée à l'ARN bicaténaire, le rôle du premier motif carboxy-terminal de $\sigma 3$ serait de prévenir l'effet inhibiteur du domaine amino-terminal sur l'attachement de la protéine à l'ARN bicaténaire. La structure de $\sigma 3$ est résumée à la figure 9.

7.4 Rôle de la protéine $\sigma 3$ dans la régulation de la synthèse protéique

L'inhibition de la synthèse protéique de la cellule hôte est l'une des principales conséquences d'une infection à réovirus. L'observation que les cellules L929 infectées subissent une inhibition de la synthèse des protéines cellulaires 3 à 6 heures avant l'inhibition de la synthèse protéique totale a permis de conclure que la diminution

graduelle de la synthèse des protéines cellulaires s'effectuait conjointement avec une synthèse efficace des protéines virales (Zweerink and Joklik, 1970). Étant donné que la synthèse protéique totale diminue très peu lors de l'infection virale, il a été proposé qu'un facteur viral était responsable d'une modification de la machinerie traductionnelle de la cellule infectée. La recombinaison génique entre les réovirus de sérotypes différents a permis d'attribuer cette propriété au gène S4 de réovirus.

La protéine $\sigma 3$ stimulerait spécifiquement la synthèse des protéines virales. En effet, il a été démontré que la traduction *in vitro* des ARNm viraux tardifs était activée en présence d'extraits de cellules L929 infectées (Skup and Millward, 1980b), et que cette stimulation préférentielle était attribuable à la protéine $\sigma 3$ (Lemay and Millward, 1986c; Lemieux *et al.*, 1987; Lemieux *et al.*, 1984). L'implication de la protéine $\sigma 3$ dans la régulation de la synthèse protéique est soutenue par la découverte que cette protéine peut inhiber l'activation de la PKR (Beattie *et al.*, 1995a; Imani and Jacobs, 1988; Lloyd and Shatkin, 1992). Puisque la quantité d'ARN bicaténaire nécessaire à l'activation de la PKR est 10 fois plus importante pour des extraits de cellules COS exprimant $\sigma 3$ que la quantité requise pour l'activation de la PKR issue d'extraits de cellules COS non transfectées (Imani and Jacobs, 1988), il a été suggéré que la protéine $\sigma 3$ inhibait la phosphorylation de la PKR en séquestrant l'ARN bicaténaire. D'autres résultats viennent également appuyer cette hypothèse. La protéine $\sigma 3$ permet le rétablissement de la synthèse des protéines virales chez des cellules infectées soit par un virus de la vaccine défectif pour le gène E3L, soit par un adénovirus défectif pour le gène VA I (dl331) (Beattie *et al.*, 1995a; Lloyd and Shatkin, 1992), et suite à la co-

transfection du gène S4 et de gènes rapporteurs, $\sigma 3$ est associée à l'effet stimulateur observé sur la traduction des ARNm des gènes CAT (chloramphénicol acétyltransférase) et β -galactosidase (Giantini and Shatkin, 1989; Lloyd and Shatkin, 1992; Martin and McCrae, 1993).

Finalement la formation de complexes entre $\sigma 3$ et $\mu 1/\mu 1C$ interférerait avec la capacité de la protéine $\sigma 3$ à lier l'ARN bicaténaire. Cette hypothèse découle d'expériences démontrant que la forme complexée de $\sigma 3$ ($\sigma 3$ - $\mu 1/\mu 1C$) n'a jamais été isolée sur colonne d'ARN bicaténaire (Huisman and Joklik, 1976), et que l'effet stimulateur de $\sigma 3$ sur la traduction des ARNm du gène rapporteur CAT diminue lorsque $\sigma 3$ est co-exprimé avec $\mu 1$ (Tillotson and Shatkin, 1992). Cependant, les événements conduisant $\sigma 3$ à passer d'un rôle fonctionnel à un rôle structural durant le cycle de multiplication viral demeurent inconnus.

8. Objectif du projet

L'inhibition de la synthèse des protéines cellulaires constitue l'un des principaux effets observés sur le métabolisme de la cellule lors de la multiplication des réovirus. Cet effet serait contrôlé par le processus d'activation de la PKR, et le rôle anti-PKR de $\sigma 3$ pourrait alors être impliqué dans la régulation de la synthèse protéique. L'efficacité de $\sigma 3$ à inhiber l'activation de la PKR est déterminée par son degré d'affinité pour l'ARN bicaténaire et pourrait varier suivant les souches virales. L'affinité de $\sigma 3$ pour l'ARN bicaténaire est due à la présence de deux motifs basiques

au niveau du domaine carboxy-terminal de la protéine. Des études de mutagenèse dirigée, auxquelles j'ai participé, ont permis d'attribuer une plus grande importance au deuxième motif carboxy-terminal lors d'interactions de $\sigma 3$ avec l'ARN bicaténaire (Wang *et al.*, 1996). Ces études ont également permis de suggérer que le domaine amino-terminal de $\sigma 3$ pouvait exercer un effet inhibiteur sur l'attachement de la protéine à l'ARN bicaténaire et que la fonction du premier motif carboxy-terminal serait justement d'atténuer l'effet inhibiteur de ce domaine. Ainsi, mes travaux visaient à déterminer le rôle du domaine amino-terminal de $\sigma 3$ dans la régulation de l'attachement de la protéine à l'ARN bicaténaire.

Afin de mieux comprendre la relation entre la structure et la fonction de $\sigma 3$ et déterminer les éléments responsables de la réponse antivirale induite par l'interféron, nous avons choisi d'évaluer les différentes propriétés d'un mutant thermosensible (ts453) déficient au niveau du gène S4 de réovirus. Les techniques de clonage et de séquençage avaient déjà permis d'identifier une mutation au niveau de la région amino-terminale de la protéine $\sigma 3$ du virus ts453 (N16K). Cette substitution serait à l'origine du phénotype thermosensible, le virus ts453 étant déficient au niveau de l'assemblage de la capsid externe à température non-permissive (37°C).

La caractérisation de la protéine $\sigma 3$ N16K a été réalisée en exprimant la protéine à l'aide de systèmes d'expression procaryote (système pET) et eucaryote (cellules COS). Pour établir l'influence de $\sigma 3$ dans la réponse antivirale du mutant ts453, des cellules L929, préalablement traitées à l'interféron- β , ont été infectées avec des virions ts453 et des particules sous-virales infectieuses dépourvues de molécules

σ_3 . Subséquemment à un marquage métabolique des protéines (^{35}S), il est ainsi possible de déterminer l'effet de l'interferon sur la synthèse protéique. Étant donné que la nature segmentée du génome ne nous permet pas de pratiquer la génétique inverse, l'existence de mutants thermosensibles s'avère très utile pour étudier le rôle fonctionnel des différentes protéines de réovirus. Les résultats concernant la caractérisation du virus ts453 sont présentés au chapitre 2.

Cependant, les inconvénients du système d'expression bactérien et du système d'expression transitoire employant des cellules eucaryote limitent notre étude de la protéine σ_3 . Afin de procéder à des études biochimiques et de déterminer les propriétés fonctionnelle de σ_3 dans l'établissement d'infections persistantes, nous avons donc choisi d'exprimer la protéine σ_3 chez la levure *Pichia pastoris* et dans des cellules de souris permettant de contrôler les niveaux d'expression de la protéine. L'ensemble des résultats obtenus compose le chapitre 3.

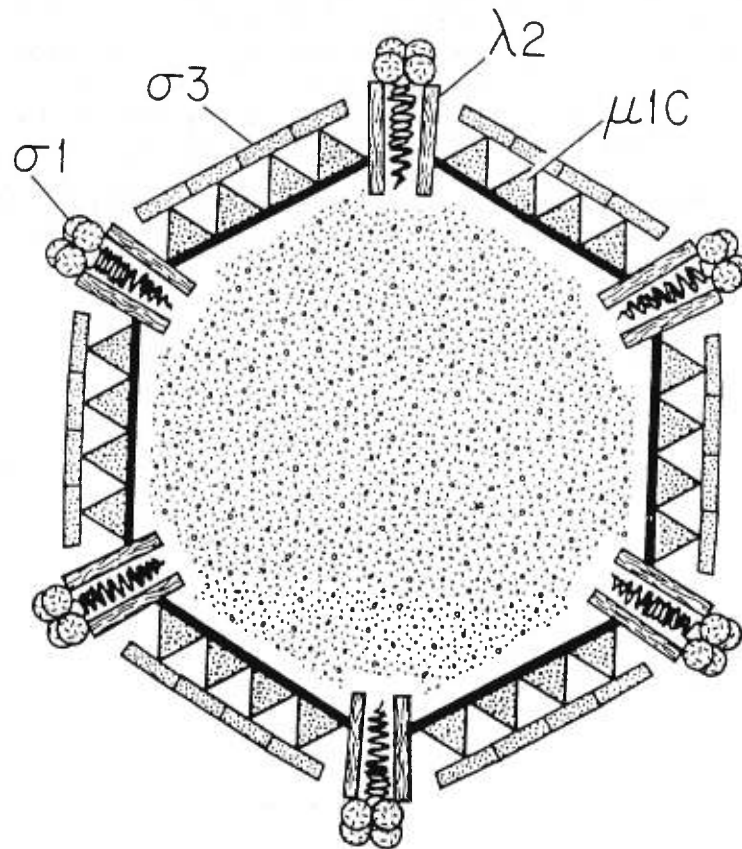


Figure 1. Schéma de la capside externe du réovirion.
(Schiff et Field, 1990)

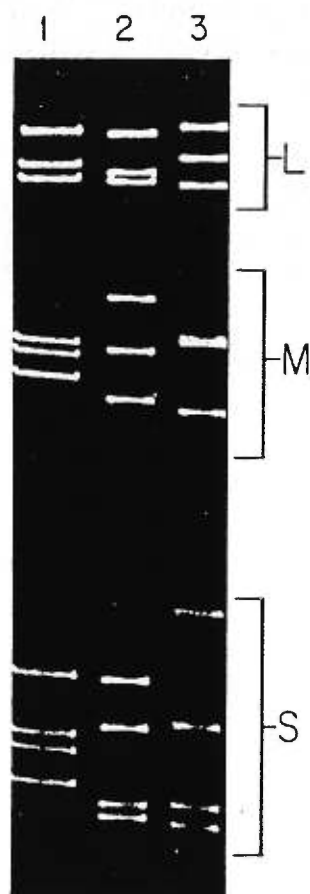


Figure 2. Segments d'ARN bicaténaire composant le génome des réovirus T2J (1), T1L (2), et T3D, (3). Les différents segments sont séparés sur gel de polyacrylamide. (Schiff et Field, 1990)

Segments	Protéines	Nombre d'acides aminés	Nombre de molécules par virion	Localisation
LI	$\lambda 3$	1267	120	capside interne
L2	$\lambda 2$	1289	60	capside interne
L3	$\lambda 1$	1223	12	capside interne
M1	$\mu 2$	687	12	capside interne
M2	$\mu 1$	708	24	capside externe
	$\mu 1C$	666	600	capside externe
	$\mu 1N$	42	?	capside externe
M3	μNS	719	-	-
	μNSC	678	-	-
S1	$\sigma 1$	455	36	capside externe
	$\sigma 1NS$	120	-	-
S2	$\sigma 2$	418	240	capside interne
S3	σNS	366	-	-
S4	$\sigma 3$	365	600	capside externe

Tableau. Segments composant le génome du réovirus T3D et leurs protéines correspondantes. (Joklik, 1994)

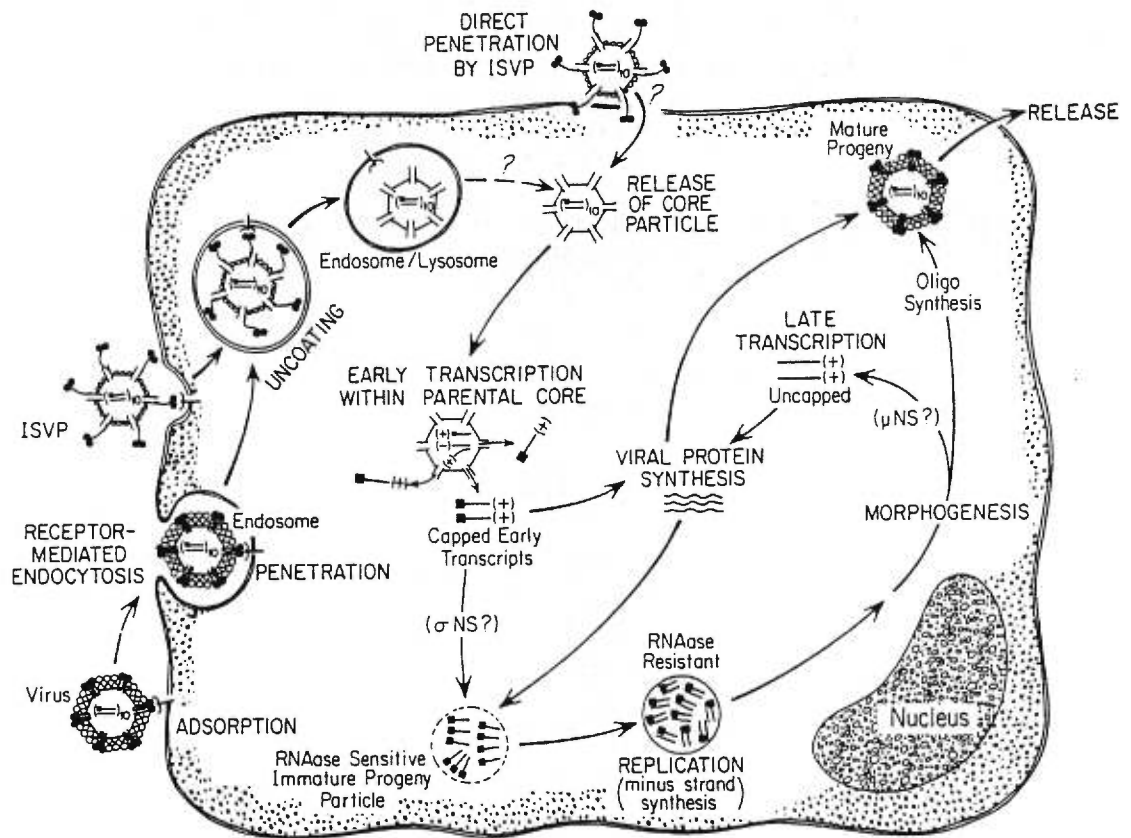


Figure 3. Cycle de multiplication des réovirus.
(Schiff et Field, 1990)

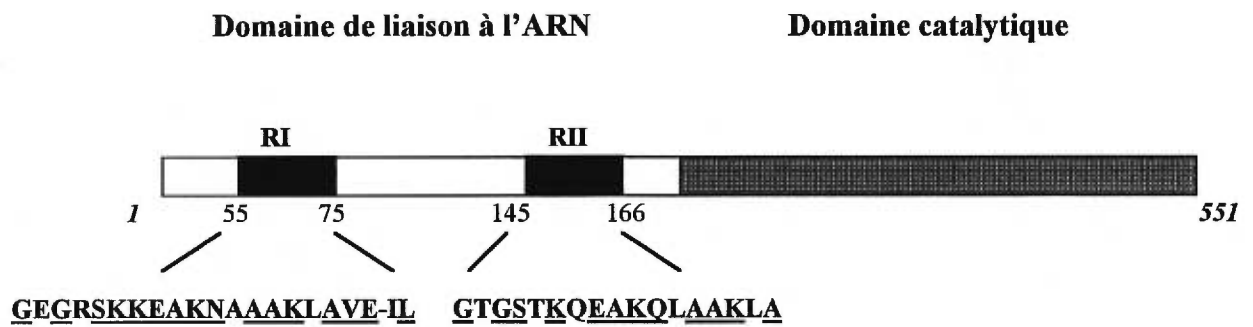


Figure 4. Structure de la PKR. Les acides aminés appartenant aux séquences consensus du domaine de liaison à l'ARN sont soulignés.
(d'après McMillan *et al*, 1995)

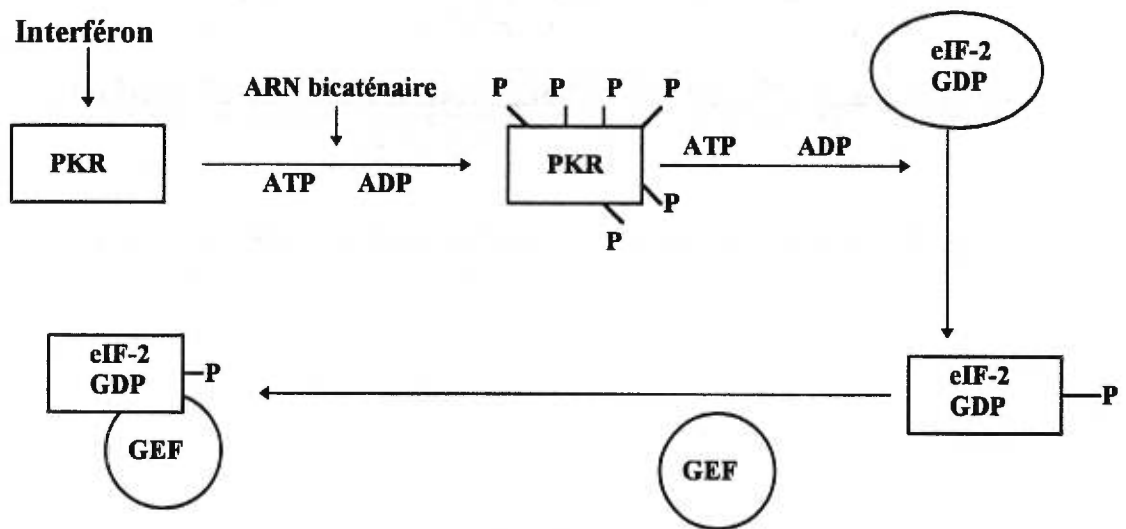


Figure 5. Mécanisme d'activation de la PKR.
(d'après Sonenberg, 1990)

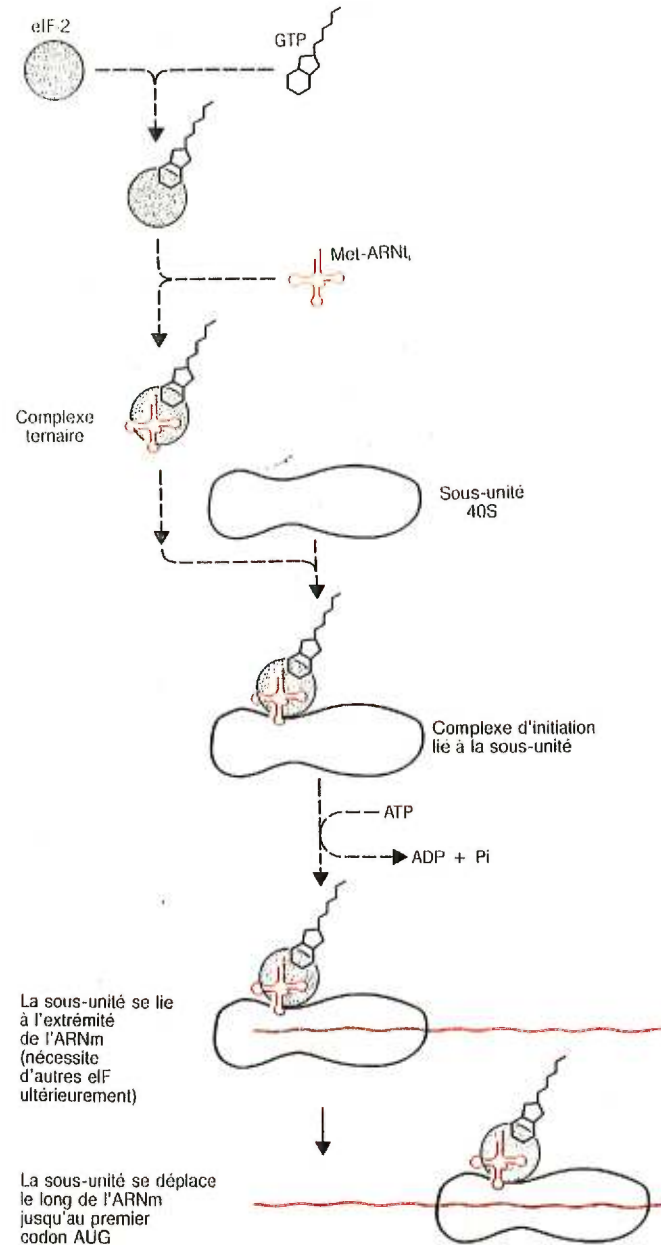


Figure 6. Initiation de la traduction chez les cellules eucaryotes. Dans l'initiation eucaryote, eIF-2 forme un complexe ternaire avec le Met-ARNi. Ce complexe se lie aux sous unités libres 40S qui s'unissent à l'extrémité 5' de l'ARNm et se déplacent vers le site d'initiation (Lewin, 1988).

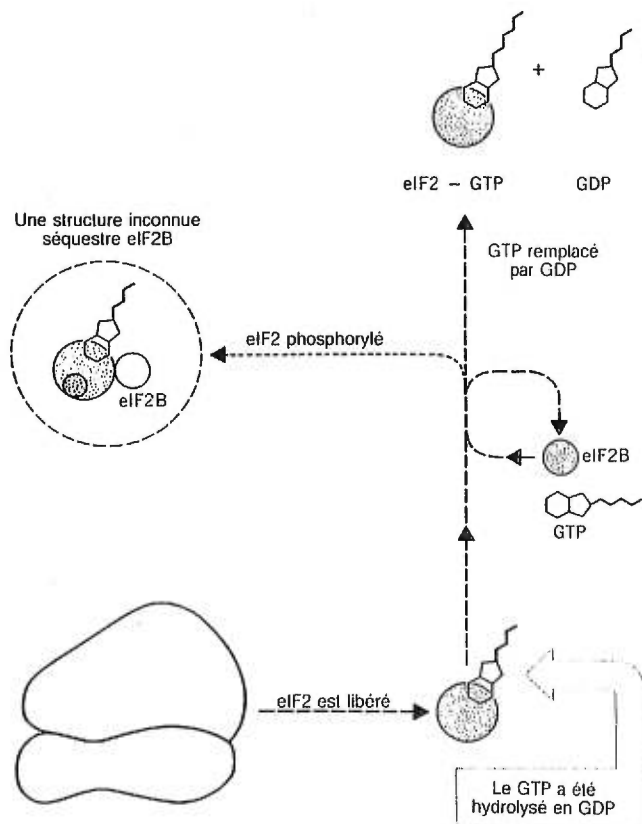


Figure 7. Libération du facteur d'initiation eIF-2. eIF-2 est libéré à la fin de la réaction d'initiation eucaryote sous forme d'un complexe binaire contenant le GDP: le facteur eIF-2; le facteur GEF (eIF-2B) est nécessaire pour remplacer le GDP par le GTP afin que le facteur eIF-2 puisse être utilisé à nouveau (Lewin, 1988).

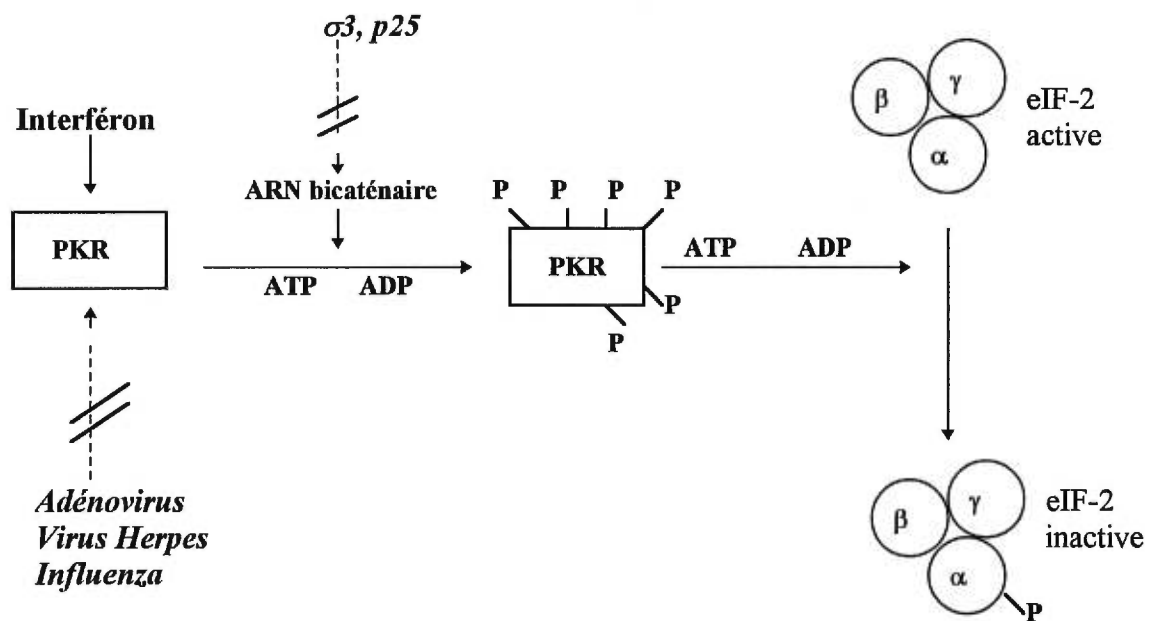
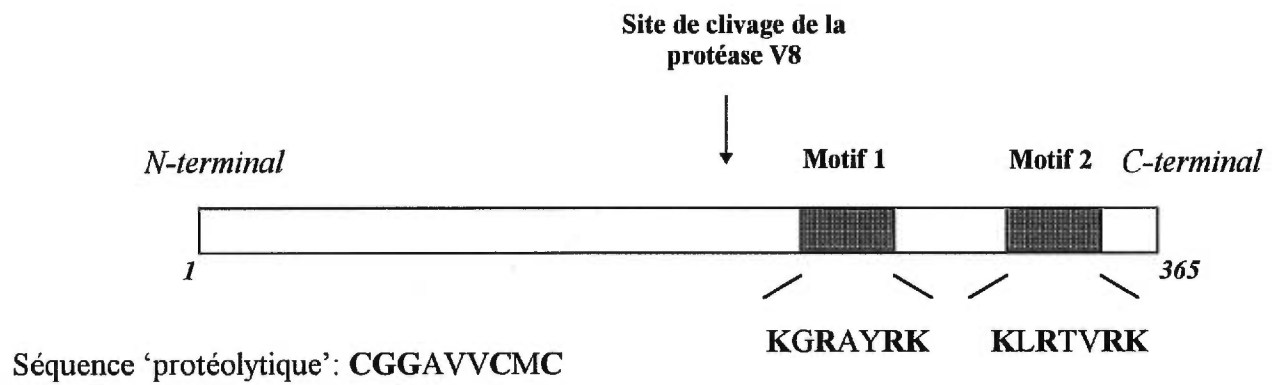


Figure 8. Mécanismes employés par différents virus pour inhiber l'activation de la PKR.



Motif de liaison au zinc: **CMHC-X12-HLPHRC**

Figure 9. Structure de la protéine $\sigma 3$.

Chapitre 2

Article

Avant propos

Nous avons profité de l'existence du mutant thermosensible ts453 déficient au niveau du gène S4 de réovirus afin d'établir une corrélation entre le degré d'affinité de la protéine $\sigma 3$ à l'ARN bicaténaire, la distribution intracellulaire de la protéine et le degré de sensibilité du réovirus à l'effet antiviral induit par l'interféron. La caractérisation de la protéine $\sigma 3$ renfermant la mutation thermosensible (N16K) a permis de démontrer que la région amino-terminale de $\sigma 3$ n'était pas seulement impliquée dans l'association de la protéine avec $\mu 1$, mais également dans la régulation du processus d'activation de la PKR en contrôlant le degré d'affinité de $\sigma 3$ pour l'ARN bicaténaire. La découverte que le virus ts453 était résistant à l'effet de l'interféron confirme l'importance des molécules $\sigma 3$ provenant des virions dans la régulation de la synthèse protéique.

Les résultats qui composent ce chapitre ont été soumis à la revue 'Virology'. Je tiens à remercier Taoufik Mabrouk pour avoir initié le projet concernant la localisation nucléaire de la protéine $\sigma 3$ et Simon Garzon pour ses travaux effectués en microscopie électronique. Ce chapitre correspond à la version finale de l'article soumis.

**Characterization of the Thermosensitive ts453
Reovirus Mutant: Increased dsRNA Binding and
Altered Subcellular Localization of $\sigma 3$ Protein
Correlates with Interferon Resistance**

**JOSÉE BERGERON, TAOUFIK MABROUK, SIMON GARZON and
GUY LEMAY***

*Département de microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal,
Québec, Canada*

Running title: Reovirus ts453 thermosensitive mutant

Correspondent Footnote

*Corresponding author: Mailing address: Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, P. O. Box 6128, Station Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7. Tel: (514)-343-2422. Fax (514)-343-5701. E-mail address: lemayg@ERE.UMontreal.CA

Abstract

The mutation harbored by reovirus ts453 thermosensitive mutant has been assigned to the S4 gene encoding the major outer capsid protein $\sigma 3$. Previous gene sequencing has identified a non-conservative amino acid substitution located near the zinc finger of $\sigma 3$. Co-expression in COS cells of the $\sigma 3$ protein presenting this amino acid substitution (N16K), together with the other major capsid protein $\mu 1$, has also revealed an altered interaction between the two proteins; this altered interaction prevents the $\sigma 3$ -dependent cleavage of $\mu 1$ to $\mu 1C$. This could explain the lack of outer capsid assembly observed during ts453 virus infection at nonpermissive temperature. In the present study, we pursued the characterization of this mutant $\sigma 3$ protein. Although the N16K mutation is located close to the zinc finger region, it did not affect the ability of the protein to bind zinc. In contrast, a Northwestern blot assay indicated that this mutation, as well as mutations within the zinc finger motif itself, can increase binding of the protein to double-stranded RNA (dsRNA). The N16K mutant protein was also found to be more efficiently transported to the nucleus than the wild-type protein, and co-expression of $\mu 1$ did not affect this nuclear distribution contrary to the situation observed with wild-type protein. The lack of association with $\mu 1$, and/or the increased dsRNA-binding activity of $\sigma 3$, could be responsible for the partial resistance of the ts453 virus to interferon treatment. This resistance was lost upon chymotrypsin treatment of virions to

produce intermediate subviral particles devoid of $\sigma 3$. These observations could have important consequences in the context of viral protein synthesis regulation in cells infected with either virions or infectious subviral particles.

Introduction

The genome of mammalian reoviruses consists of ten double-stranded RNA segments enclosed in an inner and outer protein shell (Reviewed by: Nibert *et al.*, 1996). Each of these RNA segments encodes a viral protein, with the exception of the dicistronic S1 gene, which produces two proteins encoded in different reading frames. The nature of the viral genome and its mode of replication has precluded the development of a reverse-genetic strategy for the study of reovirus protein functions. However, the segmented nature of the genome has allowed the generation of reassortant viruses and facilitated the assignment of temperature-sensitive (ts) mutations to specific genes (Ramig and Fields, 1983; Nibert *et al.*, 1996). Hence, reovirus thermosensitive mutants represent an interesting alternative approach to study the functional roles of viral proteins. Such a conditional temperature-sensitive mutant is the ts453 virus derived from reovirus serotype 3 Dearing (T3D) and belonging to complementation group G (Cross and Fields, 1972); the mutation was assigned to the S4 gene, known to encode the $\sigma 3$ viral protein (Mustoe *et al.*, 1978).

The $\sigma 3$ protein is present in about 600 molecules per mature virion and, along with $\mu 1C$, is one of the two major components of the outer capsid (Metcalf *et al.*, 1991; Nibert *et al.*, 1996). Its association with $\mu 1$ contributes to the stability of $\mu 1$ -related polypeptides, thus allowing the cleavage of $\mu 1$ to $\mu 1C$ (Tillotson and Shatkin, 1992; Mabrouk and Lemay, 1994b). In addition to its structural role, $\sigma 3$ harbors two functional domains that can be separated following V8 protease digestion: an amino-

terminal domain that has a zinc-binding motif, and a carboxy-terminal region that has affinity for double-stranded RNA (dsRNA) (Schiff *et al.*, 1988; Miller and Samuel, 1992; Wang *et al.*, 1996).

The amino-terminal domain of $\sigma 3$ appears to be involved in the interaction with $\mu 1$, as first suggested by the study of the ts453 virus mutant. The mutant is defective in outer capsid assembly when grown at nonpermissive temperature and exhibits a non-conservative mutation near the zinc-binding motif (Danis *et al.*, 1992). It appears that misfolding of the thermosensitive $\sigma 3$ protein expressed at the nonpermissive temperature could be involved in phenotypic changes associated with this mutation (Shing and Coombs, 1996). When co-expressed in COS cells, the $\sigma 3$ protein presenting this unique amino acid substitution fails to interact with $\mu 1$, thereby preventing $\mu 1C$ accumulation (Mabrouk and Lemay, 1994b). Additional studies using either co-transfection of $\mu 1$ and $\sigma 3$ expression vectors or *in vitro* translated proteins further support the importance of $\sigma 3$ amino-terminal domain in its interaction with $\mu 1$ (Mabrouk and Lemay, 1994b; Shepard *et al.*, 1996).

As for the dsRNA-binding activity of $\sigma 3$, it is believed to be involved in translational regulation through an inhibition of the cellular double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) (Giantini and Shatkin, 1989; Lloyd and Shatkin 1992; Seliger *et al.*, 1992; Martin and McCrae, 1993; Beattie *et al.*, 1995; Mabrouk *et al.*, 1995). Viral infection and treatment of cells with interferon are known to induce higher PKR expression level, the protein acting as an host-cell antiviral mechanism; accordingly, numerous viruses have evolved strategies to counteract PKR action

(Reviewed by: Samuel, 1991; Katze, 1992; 1993; Hovanessian, 1993). In addition to its anti-PKR action, the affinity of $\sigma 3$ for double-stranded RNA appears important for the partial nuclear localization of the protein (Yue and Shatkin, 1996).

The property of $\sigma 3$ to bind dsRNA is conferred by the presence of two basic motifs, within the ~85 amino acids carboxy-terminal domain (Miller and Samuel, 1992; Denzler and Jacobs, 1994; Mabrouk *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1996). Northwestern blot analysis of full-length and amino-truncated proteins have revealed that the second basic motif is more important for direct RNA interaction (Miller and Samuel, 1992; Wang *et al.*, 1996); in the absence of the N-terminal portion of the protein, mutations affecting the first basic motif appeared to have only minimal effect on RNA binding (Wang *et al.*, 1996). Northwestern blot has not only revealed that the zinc finger is dispensable for dsRNA binding, but also suggested that the amino-terminal portion of $\sigma 3$ could exert an inhibitory effect on the dsRNA affinity conferred by the carboxy-terminal portion of the protein (Schiff *et al.*, 1988; Miller and Samuel, 1992; Wang *et al.*, 1996)

In the present study, bacterially-expressed $\sigma 3$ proteins were used to evaluate the consequences on RNA binding of the N16K amino acid substitution present near the zinc finger of $\sigma 3$ in the ts453 virus. The thermosensitive mutant protein was found to exhibit an increased dsRNA binding and an altered subcellular distribution when transiently expressed in COS cells. The effect of these properties on interferon sensitivity was thus investigated. Mouse L929 cells treated with interferon were infected with either virions or ISVPs (Infectious Subviral Particles); the synthesis of

viral proteins in ts453-infected cells was found to be resistant to interferon when compared to the sensitivity in cells infected with the wild-type virus. This difference between wild-type and ts453 virus was almost abolished when infections were carried out with infectious subviral particles lacking $\sigma 3$. This supports the idea that the dsRNA-binding activity of $\sigma 3$ can act as a major determinant in reovirus resistance to interferon. These observations also raise the possibility that the translational regulation exerted by $\sigma 3$ could occur early during reovirus multiplication and that it is partly mediated by the $\sigma 3$ molecules present in the infecting virions.

Materials and methods

Construction of bacterial expression vectors

The cloned S4 gene encoding σ_3 was subjected to site-directed mutagenesis on double-stranded DNA using the unique site elimination procedure (Deng and Nickoloff, 1992). Mutants of the amino-terminal domain were previously cloned in plasmid vectors suitable for transient expression in COS cells (Mabrouk and Lemay, 1994a), whereas mutants of the carboxy-terminal region were already available in bacterial expression vectors (Wang *et al.*, 1996). To obtain mutants harboring point mutations affecting both the amino-terminal and carboxy-terminal domains, the mutated S4 genes of the eukaryotic expression vectors were amplified by polymerase chain reaction (PCR) performed with a Gene Amp™ DNA Amplification reagent kit (Perkin Elmer) using Ampli Taq DNA polymerase. Oligonucleotides used were 5' CCGATTGTCCCATATGGAGGTGTGC and 5' GGAACGGCTGCGCTGCGACAGTG 3'. This procedure was used to introduce a *NdeI* site at the 5' end of the S4 coding sequence, as underlined. The N-terminal fragments were then obtained following digestion with *NdeI* and *SpeI* and subcloned to replace the homologous fragments in bacterial vectors, which provided the C-terminal mutations. The final constructs were verified by direct sequencing of denatured plasmid DNA.

Protein expression and Northwestern blot assay

Bacterial expression vector pET21a and bacterial *E.coli* strain BL21(DE3) were originally obtained from Novagen Inc. Plasmids harboring mutated S4 genes under the control of the T7 promoter were transformed in BL21(DE3) strain expressing the T7 inducible promoter. Induction of bacterial cultures was performed as previously described (Wang *et al.*, 1996). For Northwestern blot analysis, proteins were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred onto nitrocellulose filters (Laemmli, 1970; Towbin *et al.*, 1979). The $\sigma 3$ dsRNA-binding assay was performed using radioactive reovirus RNA (Wang *et al.*, 1996). Quantification of the autoradiograms was done with a laser personal densitometer (Molecular Dynamics). The filter was then stained with 0.1% fast green in fixing solution (40% methanol-10% acetic acid) to reveal filter-bound proteins.

Cells and viruses.

Mouse L929 fibroblasts and initial inoculum of wild-type reovirus serotype 3 Dearing (T3D) were originally obtained from the American Type Culture Collection, whereas initial inoculum of the ts453 virus was a generous gift from Dr. W. K. Joklik (Department of Microbiology and Immunology, Duke University Medical Center,

Durham, NC). COS-7 cells were provided by Dr. E. A. Cohen (Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal). Viral stocks of T3D and ts453 were propagated at permissive temperature (32°C) on L929 cell monolayers, whereas L929 and COS-7 cells were maintained as previously described (Danis and Lemay, 1993; Mabrouk and Lemay, 1994b).

Transfection, radiolabeling and Western immunoblotting

COS-7 cells were seeded the day before transfection at a concentration of 5×10^5 cells per 100 mm diameter tissue culture dishes. Cells were then transfected with 10 μ g of DNA using the standard calcium phosphate co-precipitation procedure (Graham and van der Eb, 1973). After 16 hours of contact with the precipitate, cells were subjected to three washes in phosphate-buffered saline (PBS) and fresh medium was added. For radiolabeling, cell monolayers were washed three times in PBS and starved for 30 minutes in a methionine-free medium (MEM without methionine, Gibco/BRL) supplemented with 1% glutamine. Labeling was performed for one hour with Trans³⁵S-label (ICN; 1000 Ci/mmol) at a concentration of 50 μ Ci/ml. Western immunoblotting, using rabbit antireovirus antiserum (Lee Biomolecular) and goat anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase conjugate (GIBCO/BRL), was achieved as previously described (Mabrouk and Lemay, 1994b).

Zinc affinity chromatography

COS-7 cells were recovered 48 hours post-transfection, washed in PBS, and harvested in 300 μ l of column buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl) containing 0.1% NP-40. Zinc chelate affinity adsorbent (Boehringer-Mannheim) was used as described (Porath *et al.*, 1975). Briefly, samples were loaded onto zinc affinity column and left for two hours at 4°C. Thereafter, the column was extensively washed with buffer containing 150 mM and 800 mM NaCl to reduce non-specific binding. Selective elution was performed using 0.1 M NaPO₄, 0.8 M NaCl with decreasing pH [7.5, 7.0, 6.5, 6.0 and 5.5], and final elution was performed with 0.2 M EDTA [pH 6.0]. Protein samples were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography.

Cell fractionation

Transfected COS-7 cells were recovered in PBS by centrifugation at 5000 rpm for 15 minutes. Cell pellets were resuspended in hypotonic buffer A (10 mM HEPES [pH 8.0], 10 mM potassium acetate, 1.5 mM magnesium acetate and 1 mM DTT), incubated 10 minutes at 4°C and centrifuged at 10 000 rpm for 10 minutes. The supernatants were saved as the cytoplasmic fractions. Following the same procedure, pellets were washed in buffer B (10 mM PIPES-HCl [pH 6.8], 100 mM KCl, 2.5 mM

MgCl₂, 0.3 M sucrose, 1% Triton X-100) and resuspended in buffer C (10 mM Tris-HCl [pH7.5], 10 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1% Tween 20, 0.5% sodium deoxycholate). The supernatant obtained subsequently to the treatment with buffer C was considered as the cytoskeletal fraction. Finally, the remaining pellets, composed of nuclei, were resuspended in Laemmli's sample buffer (Laemmli, 1970). The different protein fractions were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting.

Immunoelectron-microscopy

COS-7 cells were fixed 48 hours post-transfection with 1% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer pH 7.2 and washed with the same buffer containing 4.5% sucrose. Fixed cells were then dehydrated, embedded into araldite 502 and thin-sectioned. A monospecific anti- σ 3 antiserum was applied to the sectioned cells, incubated for 1 hour at room temperature, and rinsed three times in washing buffer (50 mM Tris-HCl [pH8.0], 150 mM NaCl and 1% bovine serum albumin). Thereafter, protein A conjugated to colloidal gold (8 nm beads) was added, incubated and washed as previously indicated. Following uranyl acetate and lead citrate staining, labeled cells were examined using a Philips EM300 electron microscope.

***In vitro* generation of infectious subviral particles (ISVPs)**

Viral stocks were prepared following infection of L929 cells in absence of serum and were treated with 20 $\mu\text{g/ml}$ of chymotrypsin (Sigma, Bovine pancreas type I-S) for 30 minutes at 37°C. As control, half of each viral stocks was submitted to the same procedure in the absence of chymotrypsin. Viral titer of treated and untreated viral stocks was determined by using the 'Tissue Culture Infection Dose 50% (TCID₅₀) method (Reed and Muench, 1938). For protein analysis, L929 cells were seeded at a concentration of 5×10^5 cells per 60 mm diameter tissue culture dishes the day before infection.

Viral infection and interferon treatment

When necessary, cells were pre-treated with mouse β -interferon (Lee Biomolecular) at a concentration of 250 international units (IU)/ml for 16 hours. Subsequently, cell monolayers were infected at an MOI of 3 PFU/cell with either ISVPs or complete virions; metabolic radiolabeling was performed 20 hours post-infection at 37°C. Cells were then recovered by centrifugation and lysed in Tris-buffered saline (10 mM Tris-HCl [pH7.5], 150 mM NaCl) containing 0.1% NP-40. Labeled proteins were analyzed by SDS-PAGE followed by autoradiography. For the

infections carried out at 32°C, incubation times for infection and radiolabeling were doubled.

***In vivo* uncoating of viral particles**

Radiolabeled viral particles were obtained by infecting L929 cells with either wild-type (T3D) or ts453 viruses at an MOI of 25 PFU/cell. Cells were then incubated for 12 hours at 32°C in minimal Eagle's medium without methionine (MEM, Gibco/BRL). Infected cells were subsequently incubated 16 hours in MEM reduced to one-tenth of normal methionine concentration and supplemented with 100 μ Ci/ml of Trans³⁵S-label (ICN; 1000 Ci/mmol). Viral particles were recovered by freeze extraction of infected cells (Smith *et al.*, 1969) and dialyzed overnight against 100 volumes of MEM. The radiolabeled viral particles were adsorbed 1 hour at 4°C onto cell monolayers and removed. Cells were then washed three times in non-radioactive medium and incubated at the corresponding temperature (either 32°C or 37°C) for 5 hours and recovered. Viral proteins were detected by SDS-PAGE followed by autoradiography.

Results

Effects of amino-terminal mutations on dsRNA binding

In an effort to elucidate the effects of the amino-terminal portion of $\sigma 3$ on dsRNA-binding, pET expression vectors were first designed to harbor mutations within the region encoding the N-terminal domain of the protein. The amino acid substitutions used were the ones already described as affecting zinc binding (C51A and C73A) (Mabrouk *et al.*, 1994a) and the non-conservative substitution (N16K) previously found in the thermosensitive ts453 virus (Danis *et al.*, 1992). In turn, these substitutions were combined to mutations affecting the first C-terminal basic motif of the protein (K,R234-240A or R236A basic amino acid substitutions) (Wang *et al.*, 1996). The positions of the different amino acid substitutions are summarized in Fig. 1. The different proteins were expressed in bacterial cells by taking advantage of the T7 promoter/polymerase system (Studier, 1990). The expression of $\sigma 3$ mutant proteins was first verified by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining (data not shown). The capacity of each mutant to bind dsRNA was then analyzed by performing a Northwestern blot assay on full-length proteins. In each case, the amino-terminal amino acid substitutions did increase $\sigma 3$ ability to bind dsRNA when compared to the wild-type protein (Fig. 2A); the presence of similar amounts of filter-bound proteins was verified by fast green staining (Fig. 2B). Moreover, the mutations

affecting the first C-terminal motif, known to significantly reduced RNA binding, had less effect when combined to the N-terminal amino acid substitutions. In fact, it was possible to recover RNA binding by associating the R236A substitution with either one of the mutations affecting the amino-terminal region of the protein (Fig. 2A, lanes 6, 9 and 12). However, such a recovery was only partially observed when the more drastic substitution of four basic amino acids was introduced in the same C-terminal motif (Fig. 2A, lanes 5, 8 and 11).

Effect of the thermosensitive mutation on zinc binding

Initially, the ts453 mutant has been shown to be defective in outer capsid assembly (Morgan and Zweerink, 1974; Danis *et al.*, 1992). In addition to preventing $\sigma 3$ - $\mu 1$ interaction (Mabrouk *et al.*, 1994), the preceding experiments showed that the N16K substitution of a lysine by an asparagine increases dsRNA binding. Since the N16K substitution is located near the zinc finger and since it has been recently reported that alterations of the zinc-binding motif can also preclude $\sigma 3$ - $\mu 1$ association (Shepard *et al.*, 1996), it should be determined whether the N16K substitution directly interferes with the ability of the protein to bind zinc. This point was examined by an assay based on a modification of the zinc-chelate affinity chromatography using radiolabeled proteins produced from transfected COS-7 cells. In this assay, proteins retained on the column through their interaction with zinc ions are eluted with a

chelating agent (EDTA) and analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. A similar percentage of $\sigma 3$ wild-type or N16K protein was retained onto the column (Fig. 3B, lanes 2 and 3). In contrast, amino acid substitutions introduced directly in the zinc finger prevented the binding even when larger amounts of the protein were applied on the column (Mabrouk *et al.*, 1994a; Fig. 3B lane 4, and data not shown).

Subcellular localization of the thermosensitive mutant $\sigma 3$ protein

Although mechanistic details are still lacking, recent results suggest that $\sigma 3$ is partly transported to the nucleus by means of its dsRNA-binding activity (Yue *et al.*, 1996). The thermosensitive $\sigma 3$ mutant having an increased affinity for dsRNA, it was thus of interest to determine whether this property could actually influence the subcellular localization of the protein. COS-7 cells were transfected with either wild-type or N16K expression vectors alone, or co-transfected with M2 expression vector encoding $\mu 1$ viral protein. Cell fractionation showed nearly equal amounts of wild-type $\sigma 3$ in all three cellular compartments (cytoplasmic, cytoskeletal and nuclear) (Fig. 4, lanes 2, 3 and 4), whereas a larger proportion of the mutant protein was found in the nucleus (Fig. 4, lanes 8, 9 and 10). Immunoreactive proteins of lower molecular weight were also observed in the nuclear fraction and likely correspond to $\sigma 3$ cleavage products. When wild-type $\sigma 3$ was co-expressed with $\mu 1$, $\sigma 3$ - $\mu 1$ association interfered with nuclear localization and consequently a larger proportion of $\sigma 3$ molecules was

found in the cytoplasmic fraction (Fig. 4, lanes 5, 6 and 7). In contrast, co-expression with $\mu 1$ did not influence the intracellular distribution of the N16K mutant, this protein being unable to interact with $\mu 1$ and to produce $\mu 1C$ (Fig. 4, lanes 11, 12 and 13); as previously observed, there was a reduction in total accumulation of $\mu 1$ - $\mu 1C$ in the absence of interaction with $\sigma 3$ (Mabrouk *et al.*, 1994b). The results also indicate that $\sigma 3$ - $\mu 1$ interaction occurs exclusively in the cytoplasm and that $\sigma 3$ alone is transported to the nucleus; $\mu 1$ and $\mu 1C$ are restricted to the cytoplasmic fraction and absent from both the cytoskeletal and nuclear fractions. The intranuclear presence of $\sigma 3$ was further verified by immunoelectron microscopy using a monospecific anti- $\sigma 3$ antibody. The presence of $\sigma 3$ in both cytoplasmic and nuclear compartments was easily detected. Although not strictly quantitative, these latter data do support the idea of a selective nuclear enrichment of $\sigma 3$ N16K protein and a lack of effect of $\mu 1$ co-expression on the subcellular localization of this mutant (Fig. 5).

Effect of interferon on synthesis of viral proteins in cells infected with wild-type or the ts453 virus

By means of its dsRNA-binding activity, $\sigma 3$ is apparently involved in translational regulation by inhibition of the cellular interferon-inducible double-stranded RNA-dependent, protein kinase (PKR) (Imani and Jacobs, 1988; Lloyd and Shatkin, 1992; Beattie *et al.*, 1995). In order to determine if the ts453 virus could

further modulate PKR, L929 cells were infected at permissive and nonpermissive temperatures following interferon treatment. Synthesis of viral proteins was then detected by metabolic radiolabeling followed by autoradiography. At nonpermissive temperature (37°C), cells infected with ts453 virus subsequent to interferon treatment exhibit synthesis of viral proteins similar to level observed in untreated cells; in contrast, synthesis of viral proteins was significantly reduced by interferon treatment at 32°C (Fig. 6C, lanes 3, 4, 9 and 10). As usually observed, cells previously treated with interferon and infected with wild-type reovirus (T3D) exhibited a decreased synthesis of viral proteins at both temperatures, and this was even more drastic at 37°C (Fig. 6B, lanes 3, 4, 9 and 10). To examine whether the interferon resistance observed with the ts453 virus could be conferred by the properties of $\sigma 3$ molecules present on infecting virions, cells were infected with ISVPs, which were generated by treatment of purified virions with chymotrypsin (Joklik, 1972; Borsa *et al.*, 1973; 1979). The ISVPs have a cleaved form of $\mu 1-\mu 1C$, known as the δ cleavage product, and are lacking $\sigma 3$ (Fig. 6A). The results show that the ISVPs derived from ts453 virions were as sensitive to interferon as the ISVPs produced from the wild-type virus at both permissive (32°C) and nonpermissive (37°C) temperatures (Fig. 6B and 6C, lanes 5, 6, 11, 12).

Efficiency of uncoating of the ts453 virus

A possible explanation for the decreased interferon resistance of ISVPs could be a reduced *in vivo* uncoating efficiency of the ts453 virus in comparison to the wild-type virus (T3D). To determine whether this was the case, radiolabeled virions were prepared and adsorbed onto L929 cells. Infected cells were then incubated at permissive and nonpermissive temperatures to allow virus internalization and uncoating. Reovirus uncoating can be detected by the appearance of the δ cleavage product of μ 1C (Sturzenbecker *et al.*, 1987; Nibert *et al.*, 1991). Analysis of viral proteins, 5 hours post-adsorption, revealed a similar amount of the δ cleavage product for both wild-type and ts453 viruses at permissive (32°C) or nonpermissive (37°C) temperatures (Fig. 7).

Discussion

The use of thermosensitive mutants is a powerful approach to study the function of viral proteins. Though most of them have been isolated many years ago, reovirus thermosensitive mutants have remained largely unexploited. The work presented herein takes advantage of the availability of ts453 thermosensitive mutant to further support the hypothesis that the amino-terminal region of $\sigma 3$ is not only involved in the interaction with $\mu 1$, but also modulates its affinity for dsRNA and ability to counteract PKR action.

In the present study, it was shown that introduction of amino acid substitutions in the zinc finger, or introduction of the ts453 N16K substitution, similarly increased $\sigma 3$ binding to dsRNA. A similar conclusion was previously obtained by Shepard *et al.* using affinity chromatography of proteins altered in their zinc finger and expressed by *in vitro* translation (Shepard *et al.*, 1996). Furthermore, Northwestern assay indicated a recovery of RNA-binding capacity for $\sigma 3$ double-mutants harboring amino acids substitutions within the zinc finger or the N16K substitution, together with mutations affecting the first C-terminal basic motif (Fig. 1 and 2).

The two C-terminal basic motifs are predicted to adopt an α -helical configuration using standard secondary structure prediction methods (Chou and Fasman, 1974; Garnier *et al.*, 1978). Yet, prediction algorithms indicate that the first C-terminal motif is less prone to form an α -helical structure than is the second basic motif (unpublished data). Although both basic motifs exhibit amino acid sequence

similarity with other dsRNA-binding proteins (See among others: Green and Mathews, 1992; McCormack *et al.*, 1992; Chang and Jacobs, 1993), it was observed that the first motif also shares less sequence homology and displays a basic stretch which is less aligned with its analogous counterparts (Yue and Shatkin, 1996). Altogether, these findings support the idea that the first C-terminal motif is dispensable, either upon removal of the N-terminal domain or subsequent to mutations introduced near or within the zinc finger; the first basic motif may be acting as a 'buffer' to prevent the inhibitory effect of the wild-type N-terminal region.

Affinity chromatography clearly showed that zinc binding is not directly affected by the N16K substitution (Fig. 3). In addition, contrary to zinc finger mutants, which are unstable when transiently expressed in COS cells (Mabrouk and Lemay 1994a) or significantly protease-sensitive when expressed by *in vitro* translation (Shepard *et al.*, 1996), the N16K mutant was apparently stable in COS cells; its total accumulation being similar to that of wild-type. Nevertheless, it cannot be completely excluded that the $\sigma 3$ produced during multiplication of ts453 virus is more unstable than the wild-type protein, since viral assembly could likely play a role in protein stability; recently published data did suggest a reduced stability of the $\sigma 3$ protein during viral infection with the ts453 virus (Shing and Coombs, 1996). It thus appears that an alteration of the zinc-binding ability of the protein is not responsible for the stimulatory effect on dsRNA-binding activity, but that it is rather a conformational change exerted by amino acid substitutions within the zinc finger or surrounding this

motif of the protein. In fact, it is well known that zinc fingers can be important determinants of protein conformation (See for example: McIntyre *et al.*, 1993).

The presence of $\sigma 3$ in the nucleus has been recently reported and the dsRNA-binding activity of the protein was held responsible for this subcellular distribution (Yue and Shatkin, 1996). Nuclear presence of $\sigma 3$ appears rather surprising considering that the nucleus does not seem to intervene during reovirus multiplication (Follett *et al.*, 1975; Zarbl and Millward, 1983), although some studies have indicated morphological alterations of the nucleus in infected cells (Chaly *et al.*, 1980). It should be mentioned that other dsRNA-binding proteins, such as the cellular PKR (RNA-dependent protein kinase) or the E3L protein of vaccinia virus (a DNA virus replicating in the cytoplasm of infected cells), were also shown to be partly localized to the nucleus (Yuwen *et al.*, 1993; Jeffrey *et al.*, 1995). In the present study, cell fractionation and immunoelectron microscopy was used instead of immunofluorescence analysis to allow more precise determination of the relative amount of $\sigma 3$ found within three distinct subcellular compartments (cytoplasm, cytoskeleton and nucleus). The fact that $\sigma 3$ N16K mutant was preferentially found in the nucleus compared to the wild-type protein further supports the importance of the dsRNA-binding activity in nuclear transport. In addition, the presence of $\mu 1$ seemed to retain a certain percentage of wild-type $\sigma 3$ molecules at the cytoplasmic level but did not influence the subcellular distribution of $\sigma 3$ N16K mutant, as expected from the lack of interaction between $\mu 1$ and this $\sigma 3$ mutant (Fig. 4). Although mechanistic details are lacking, our results with the N16K mutant are in good agreement with a

model in which the affinity of $\sigma 3$ is of crucial importance for nuclear presence while blockage of this affinity, consecutive to $\mu 1$ binding, prevents this subcellular localisation (Yue and Shatkin, 1996). Immunoelectron-microscopy of L929 cells infected with reovirus serotype 3 also revealed the nuclear presence of $\sigma 3$ (unpublished data), the labeling being particularly intense near the nucleolus, the site of rRNAs synthesis and ribosome assembly. Considering that cytoplasmic $\sigma 3$ was previously found enriched in fractions prepared from infected L929 cells by high-salt wash of ribosomes (RSW) (Lemay and Millward, 1986; Lemieux *et al.*, 1987), it is tempting to speculate that the presence of $\sigma 3$ in the nucleus is somehow related to PKR inhibition.

Previous studies have indicated that the formation of $\sigma 3$ - $\mu 1$ protein complexes interfered with the ability of $\sigma 3$ to bind dsRNA and to inhibit PKR autophosphorylation pathway. These studies include co-expression experiments in which $\mu 1$ interfered with the ability of $\sigma 3$ to stimulate reporter gene expression (Tillotson and Shatkin, 1992), and the observation that $\sigma 3$ - $\mu 1$ complexes present in infected cells were never isolated by affinity on dsRNA columns (Huisman and Joklik, 1976; Lemieux *et al.*, 1987). The binding of $\sigma 3$ with $\mu 1$ results in a conformational changes rendering $\sigma 3$ more sensitive to proteolytic degradation, this conformational change may be an important event conducting $\sigma 3$ to shift from its translational control role to its structural role (Shepard *et al.*, 1995). PKR is considered as one of the main antiviral mechanism induced by interferon, and is believed to be the main intracellular factor interfering with reovirus multiplication (Wiebe and Joklik, 1975; Miyamoto and Samuel, 1980; Gupta *et al.*, 1982; Nilsen *et al.*, 1982; De Benedetti *et al.*, 1985). Our

finding that the ts453 virus was resistant to the effect of interferon at nonpermissive temperature, together with the observation that infectious subviral particles lacking $\sigma 3$ were sensitive (Fig. 6), confirm the importance of $\sigma 3$ in PKR regulation. It is not clear whether the increased dsRNA-binding or lack of interaction with $\mu 1$ is responsible for this increased interferon resistance of ts453 virus. However, an increased dsRNA binding could be sufficient for effective PKR inhibition, since $\sigma 3$ N16K mutant was found to be more active than wild-type for the stimulation of a reporter gene in a co-transfection assay (data not shown).

Finally, the fact that ISVPs have a reduced interferon resistance suggests that viral proteins from infecting virions can play a key role in translational regulation at early stages of viral infection. A similar mechanism has been proposed for other viruses such as mengoviruses (King and Simon, 1993). Since infection by ISVPs, lacking $\sigma 3$, is believed to be the main route of natural reovirus infection at mucosal surfaces (Bodkin *et al.*, 1989; Bass *et al.*, 1990; Amerongen *et al.*, 1994), our observations raise the possibility that interferon can play a greater role in the control of reovirus infection in this context.

Altogether our results demonstrate that the amino-terminal region located near the zinc-binding motif of $\sigma 3$ is an essential determinant in viral protein interaction and PKR regulation through modulation of dsRNA-binding. This work further stresses the importance of ts mutants for the study of viral proteins in *Reoviridae*. In the absence of an adequate reverse-genetics system, the ts mutants represent the best tool to

correlate *in vitro* biochemical data with effects observed during viral multiplication cycle.

Acknowledgments

We thank Dr. A. J. Shatkin (Center for Advanced Biotechnology and Medicine, Piscataway, New Jersey) for his generous gift of the μ 1 expression vector and anti- σ 3 monospecific antibody, Dr. W. K. Joklik (Departement of Microbiology and Immunology, Duke University Medical Center, Durham. NC) for his initial gift of the ts453 mutant. We also thank Carole Danis for technical support conducing to smooth operation of the laboratory.

This work was supported by grant to G. L. from the Medical Research Consil of Canada. G. L. is also the recipient of a scholarship from the 'Fonds de la Recherche en Santé du Québec' (FRSQ) . J. B. was the recipient of a studentship from the 'Fonds pour la formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche' (FCAR), and T.M was the recipient of a studentship from the 'Agence Canadienne de Développement International' (ACDI).

References

- Amerongen, H. M., Wilson, G. R., Fields, B. N., and Neutra, M. R. (1994). Proteolytic processing of reovirus is required for adherence to intestinal M cells. *J. Virol.* **68**, 8428-8432.
- Bass, D. M., Bodkin, D., Dambrauskas, R., Trier, J. S., Fields, B. N., and Wolf, J. L. (1990). Intraluminal proteolytic activation plays an important role in replication of type 1 reovirus in the intestines of neonatal mice. *J. Virol.* **64**, 1830-1833.
- Beattie, E., Denzler, K. L., Tartaglia, J., Perkus, M. E., Paoletti, E., and Jacobs, B. L. (1995). Reversal of the interferon-sensitive phenotype of a vaccinia virus lacking E3L by expression of the reovirus S4 gene. *J. Virol.* **69**, 499-505.
- Bodkin, D. K., Nibert, M. L., and Fields, B. N. (1989). Proteolytic digestion of reovirus in the intestinal lumens of neonatal mice. *J. Virol.* **63**, 4676-4681.
- Borsa, J., Sargent, M.D., Copps, T. P., Long, D. G., and Chapman, J. D. (1973). Specific monovalent cation effects on modification of reovirus infectivity by chymotrypsin digestion in vitro. *J. Virol.* **11**, 1017-1019.
- Borsa, J., Morash, B. D., Sargent, M. D., Copps, T. P., Lievaart, P. A., and Szekely, J. G. (1979). Two modes of entry of reovirus particles into L cells. *J. Gen. Virol.* **45**, 161-170.
- Chaly, N., Johnstone, M., and Hand, R. (1980). Alterations in nuclear structure and function in reovirus-infected cells. *Clin. Invest. Med.* **2**, 141-152.

- Chang, H.-W., and Jacobs, B. L. (1992). The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the interferon-induced double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 4825-4829.
- Chou, P. Y., and Fasman, G. D. (1974). Prediction of protein conformation. *Biochemistry* **13**, 222-245.
- Cross, R. K., and Fields, B. N. (1972). Temperature-sensitive mutants of reovirus type 3: studies on the synthesis of viral RNA. *J. Virol.* **50**, 799-809.
- Danis, C., Garzon, S., and Lemay, G. (1992). Further characterization of the ts453 mutant of mammalian orthoreovirus serotype 3 and nucleotide sequence of the mutated S4 gene. *Virology* **190**, 494-498.
- Danis, C., and Lemay, G. (1993). Protein synthesis in different cell lines infected with orthoreovirus serotype 3: Inhibition of host-cell protein synthesis correlates with accelerated viral multiplication and cell killing. *Biochem. Cell Biol.* **71**, 81-85.
- DeBenedetti, A., Williams, G. J., and Baglioni, C. (1985). Inhibition of binding to initiation complexes of nascent reovirus mRNA by double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J. Virol.* **54**, 408-413.
- Deng, W. P., and Nickoloff, J. A. (1992). Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site. *Anal. Biochem.* **200**, 81-88.
- Denzler, K. L., and Jacobs, B. L. (1994). Site-directed mutagenic analysis of the reovirus sigma3 protein binding to double-stranded RNA. *Virology* **204**, 190-199.

- Follet, E. A., Pringle, C. R., and Pennington, T. H. (1975). Virus development in enucleated cells: echovirus, poliovirus, pseudorabies virus, reovirus, respiratory syncytial virus and Semliki forest virus. *J. Gen. Virol.* **26**, 183-196.
- Garnier, J., Osguthorpe, D. J., and Robson, B. (1978). Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.* **120**, 97-120.
- Giantini, M., and Shatkin, A. J. (1989). Stimulation of chloramphenicol acetyltransferase mRNA translation by reovirus capsid polypeptide sigma 3 in cotransfected COS cells. *J. Virol.* **63**, 2415-2421.
- Graham, F. L., and van der Eb, A. J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**, 151-157.
- Green, S. R., and Mathews, M. B. (1992). Two RNA-binding motifs in the double-stranded RNA-activated protein kinase, DAI. *Genes Dev.* **6**, 2478-2490.
- Gupta, S. L., Holmes, S. L., and Mehra, L. L. (1982). Interferon action against reovirus: activation of interferon-induced protein kinase in mouse L929 cells upon reovirus infection. *Virology* **120**, 495-499.
- Hovanessian, A. G. (1993). Interferon-induced dsRNA-activated protein kinase: antiproliferative, antiviral and antitumoral functions. *Semin. Virol.* **4**, 237-246.

- Huismans, H., and Joklik, W. K. (1976). Reovirus coded polypeptides in infected cells: isolation of two native monomeric polypeptides with affinity for single-stranded and double-stranded RNA respectively. *Virology* **70**, 411-424.
- Imani, F., and Jacobs, B. L. (1988). Inhibitory activity for the interferon-induced protein kinase is associated with the reovirus serotype 1 sigma 3 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7887-7891.
- Jeffrey, I. W., Kadereit, S., Meurs, E. F., Metzger, T., Bachmann, M., Schwemmler, M., Hovanessian, A. G., and Clemens, M. J. (1995). Nuclear localization of the interferon-inducible protein kinase PKR in human cells and transfected mouse cells. *Exp. Cell Res.* **218**, 17-27.
- Joklik, W. K. (1972). Studies on the effect of chymotrypsin on reovirions. *Virology* **49**, 700-715.
- Katze, M. G. (1992). The war against the interferon-induced dsRNA-activated protein kinase: can viruses win? *J. Interf. Res.* **12**, 241-248.
- Katze, M. G. (1993). Games viruses play: a strategic initiative against the interferon-induced dsRNA-activated 68,000 Mr protein kinase. *Semin. Virol.* **4**, 259-268.
- King, R. W., and Simon, E. H. (1993). The virion of mengovirus contains anti-interferon activity. *J. Interf. Res.* **13**, 1-7.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

- Lemay, G., and Millward, S. (1986). Expression of the cloned S4 gene of reovirus serotype 3 in transformed eucaryotic cells: enrichment of the viral protein in the crude initiation factor fraction. *Virus Res.* **6**, 133-140.
- Lemieux, R., Lemay, G., and Millward, S. (1987). The viral protein sigma 3 participates in translation of late viral mRNA in reovirus-infected L cells. *J. Virol.* **61**, 2472-2479.
- Lloyd, R. M., and Shatkin, A. J. (1992). Translational regulation by reovirus polypeptide $\sigma 3$: substitution for VAI RNA and inhibition of phosphorylation of the α subunit of eukaryotic initiation factor 2. *J. Virol.* **66**, 6878-6884.
- Mabrouk, T., and Lemay, G. (1994a). Mutations in a CCHC zinc-binding motif of the reovirus $\sigma 3$ protein decrease its intracellular stability. *J. Virol.* **68**, 5287-5290.
- Mabrouk, T., and Lemay, G. (1994b). The sequence similarity of reovirus $\sigma 3$ protein to picornaviral proteases is unrelated to its role in $\mu 1$ viral protein cleavage. *Virology* **202**, 615-620.
- Mabrouk, T., Danis, C., and Lemay, G. (1995). Two basic motifs of reovirus $\sigma 3$ protein are involved in double-stranded RNA binding. *Biochem. Cell Biol.* **73**, 137-145.
- Martin, P. E. M., and McCrae, M. A. (1993). Analysis of the stimulation of reporter gene expression by the sigma3 protein of reovirus in co-transfected cells. *J. Gen. Virol.* **74**, 1055-1062.
- McCormack, S. J., Thomis, D. C., and Samuel, C. E. (1992). Mechanism of interferon action: identification of a RNA binding domain within the N-terminal region

- of the human RNA-dependent P1/eIF-2 alpha protein kinase. *Virology* **188**, 47-56.
- McIntyre, M. C., Frattini, M. G., Grossman, S. R., and Laimins, L. A. (1993). Human papillomavirus type 18 E7 protein requires intact Cys-X-X-Cys motif for zinc binding, dimerization, and transformation but not for Rb binding. *J. Virol.* **67**, 3142-3150.
- Metcalf, P., Cyrklaff, M., and Adrian, M. (1991). The three-dimensional structure of reovirus obtained by cryo-electron microscopy. *EMBO J.* **10**, 3129-3136.
- Miller, F. E., and Samuel, C. E. (1992). Proteolytic cleavage of the reovirus sigma 3 protein results in enhanced double-stranded RNA-binding activity: identification of a repeated basic amino acid motif within the C-terminal binding region. *J. Virol.* **66**, 5347-5356.
- Miyamoto, N. G., and Samuel, C. E. (1980). Mechanism of interferon action: Interferon-mediated inhibition of reovirus mRNA translation in the absence of detectable mRNA degradation but in the presence of protein phosphorylation. *Virology* **107**, 461-475.
- Morgan, E. M., and Zweerink, H. J. (1974). Reovirus morphogenesis: Core-like particles in cells infected at 39 with wild-type reovirus and temperature sensitive mutants of groups B and G. *Virology* **59**, 556-565.
- Mustoe, T. A., Ramig, R. F., Sharpe, A. H., and Fields, B. N. (1978). A genetic map of reovirus. III. Assignment of the double-stranded RNA mutant groups A, B, and G to genome segments. *Virology* **85**, 545-556.

- Nibert, M. L., Furlong, D. B., and Fields, B. N. (1991). Mechanisms of viral pathogenesis. Distinct forms of reoviruses and their roles during replication in cells and host. *J. Clin. Invest.* **88**, 727-734.
- Nibert, M. L., Schiff, L. A., and Fields, B. N. (1996). Reoviruses and their replication. *In* "Fundamental virology" (B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley, Eds.), pp. 691-730. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- Nilsen, T. W., Maroney, P. A., and Baglioni, C. (1982). Inhibition of protein synthesis in reovirus-infected HeLa cells with elevated levels of interferon-induced protein kinase activity. *J. Biol. Chem.* **257**, 14593-14596.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., and Belfrage, G. (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**, 598-599.
- Ramig, R., and Fields, B. N. (1983). Genetics of reovirus. *In* "The Reoviridae" (W. K. Joklik, Ed.), pp. 197-228. Plenum Publishing Corporation, New York/London.
- Reed, L. J., and Muench, H. (1938). A simple method for estimating fifty per cent endpoints. *Amer. J. Hyg.* **27**, 493-497.
- Samuel, C. E. (1991). Antiviral actions of interferon: interferon-regulated cellular proteins and their surprisingly selective antiviral activities. *Virology* **183**, 1-11.

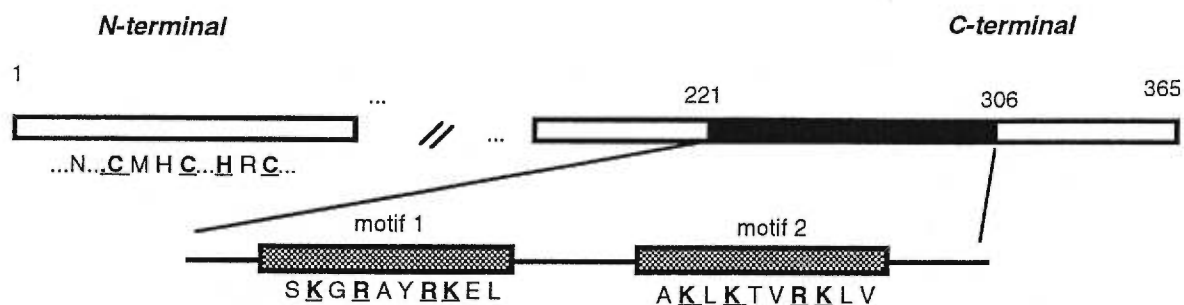
- Schiff, L. A., Nibert, M. L., Co, M. S., Brown, E. G., and Fields, B. N. (1988). Distinct binding sites for zinc and double-stranded RNA in the reovirus outer capsid protein sigma 3. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 273-283.
- Seliger, L. S., Giantini, M., and Shatkin, A. J. (1992). Translational effects and sequence comparisons of the three serotypes of the reovirus S4 gene. *Virology* **187**, 202-210.
- Shepard, D. A., Ehnstrom, J. G., and Schiff, L. A. (1995). Association of reovirus outer capsid protein $\sigma 3$ and $\mu 1$ causes a conformational change that renders $\sigma 3$ protease sensitive. *J. Virol.* **69**, 8180-8184.
- Shepard, D. A., Ehnstrom, J. G., Skinner, P. J., and Schiff, L. A. (1996). Mutations in the zinc-binding motif of the reovirus capsid protein $\sigma 3$ eliminate its ability to associate with capsid protein $\mu 1$. *J. Virol.* **70**, 2065-2068.
- Shing, M., and Coombs, K. M. (1996). Assembly of the reovirus outer capsid requires $\mu 1/\sigma 3$ interactions which are prevented by misfolded $\sigma 3$ protein in temperature-sensitive mutant tsG453. *Virus Res.* **46**, 19-29.
- Smith, R. E., Zweerink, H. J., and Joklik, W. K. (1969). Polypeptide components of virions, top component and cores of reovirus 3. *Virology* **89**, 791-810.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., and Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**, 60-89.

- Sturzenbecker, L. J., Nibert, M., Furlong, D., and Fields, B. N. (1987). Intracellular digestion of reovirus particles requires a low pH and is an essential step in the viral infectious cycle. *J. Virol.* **61**, 2351-2361.
- Tillotson, L., and Shatkin, A. J. (1992). Reovirus polypeptide sigma 3 and N-terminal myristoylation of polypeptide mu1 are required for site-specific cleavage to mu1c in transfected cells. *J. Virol.* **66**, 2180-2186.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrotransfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- Wang, Q., Bergeron, J., Mabrouk, T., and Lemay, G. (1996). Site-directed mutagenesis of the double-stranded RNA binding domain of bacterially expressed $\sigma 3$ protein. *Virus Res.* **41**, 141-151.
- Wiebe, M. E., and Joklik, W. K. (1975). The mechanism of inhibition of reovirus replication by interferon. *Virology* **66**, 229-240.
- Yue, Z., and Shatkin, A. J. (1996). Regulated, stable expression and nuclear presence of reovirus double-stranded RNA-binding protein $\sigma 3$ in HeLa cells. *J. Virol.* **70**, 3497-3501.
- Yuwen, H., Cox, J. H., Yewdell, J. W., Bennink, J. R., and Moss, B. (1993). Nuclear localization of a double-stranded RNA-binding protein encoded by the vaccinia virus E3L gene. *Virology* **195**, 732-744.

Zarbl, H., and Millward, S. (1983). The reovirus multiplication cycle. *In* "The Reoviridae" (W. K. Joklik, Ed.), pp. 197-228. Plenum Publishing Corporation, New York/London.

Figure 1. Schematic representation of the different mutations within the N-terminal portion and the first C-terminal basic motif of $\sigma 3$ expression vectors.

Underlined bold amino acids constitute the four amino acids responsible for the tetracoordination of zinc atom and the basic amino acids of the two C-terminal motifs, previously shown to be involved in dsRNA binding. The mutations used in this study are also indicated as bold underlined letters. The resulting dsRNA-binding ability, as determined by Northwestern blot assay using full-length proteins, was measured by laser densitometry of the autoradiogram shown in Fig. 2 and is relative to the signal observed with the wild-type $\sigma 3$.



<u>PROTEIN</u>	<u>STRUCTURE</u>	<u>RNA-BINDING</u> (full length)
Wild type	<p>...N...CMHC...HRC... SKGRAYRKEL</p>	+
KR234-240A	<p>...N...CMHC...HRC... SAGAAAYAAEL</p>	-
R236A	<p>...N...CMHC...HRC... SKGAAAYRKEL</p>	1/2+
N16K	<p>...K...CMHC...HRC... SKGRAYRKEL</p>	+++
N16K/K,R234-240A	<p>...K...CMHC...HRC... SAGAAAYAAEL</p>	1/2+
N16K/R236A	<p>...K...CMHC...HRC... SKGAAAYRKEL</p>	++
C73A	<p>...N...CMHC...HRA... SKGRAYRKEL</p>	++
C73A/K,R234-240A	<p>...N...CMHC...HRA... SAGAAAYAAEL</p>	-
C73A/R236A	<p>...N...CMHC...HRA... SKGAAAYRKEL</p>	+
C51A	<p>...N...AMHC...HRC... SKGRAYRKEL</p>	++
C51A/K,R234-240A	<p>...N...AMHC...HRC... SAGAAAYAAEL</p>	-
C51A/R236A	<p>...N...AMHC...HRC... SKGAAAYRKEL</p>	+

Figure 2. Double-stranded RNA-binding of the different $\sigma 3$ mutant proteins.

The $\sigma 3$ mutants were expressed in bacterial cells following IPTG induction and bacterial pellets were analyzed by SDS-PAGE (see Materials and Methods). Panel A is the autoradiogram of the Northwestern analysis using radiolabeled reovirus dsRNA. Panel B is the result of fast green staining of the proteins transferred onto the filter, indicating similar expression levels of the different mutants used in the assay. The position of the $\sigma 3$ proteins is indicated. As previously noticed, proteins harboring the K, R234-240 mutation exhibit a reduced electrophoretic mobility.

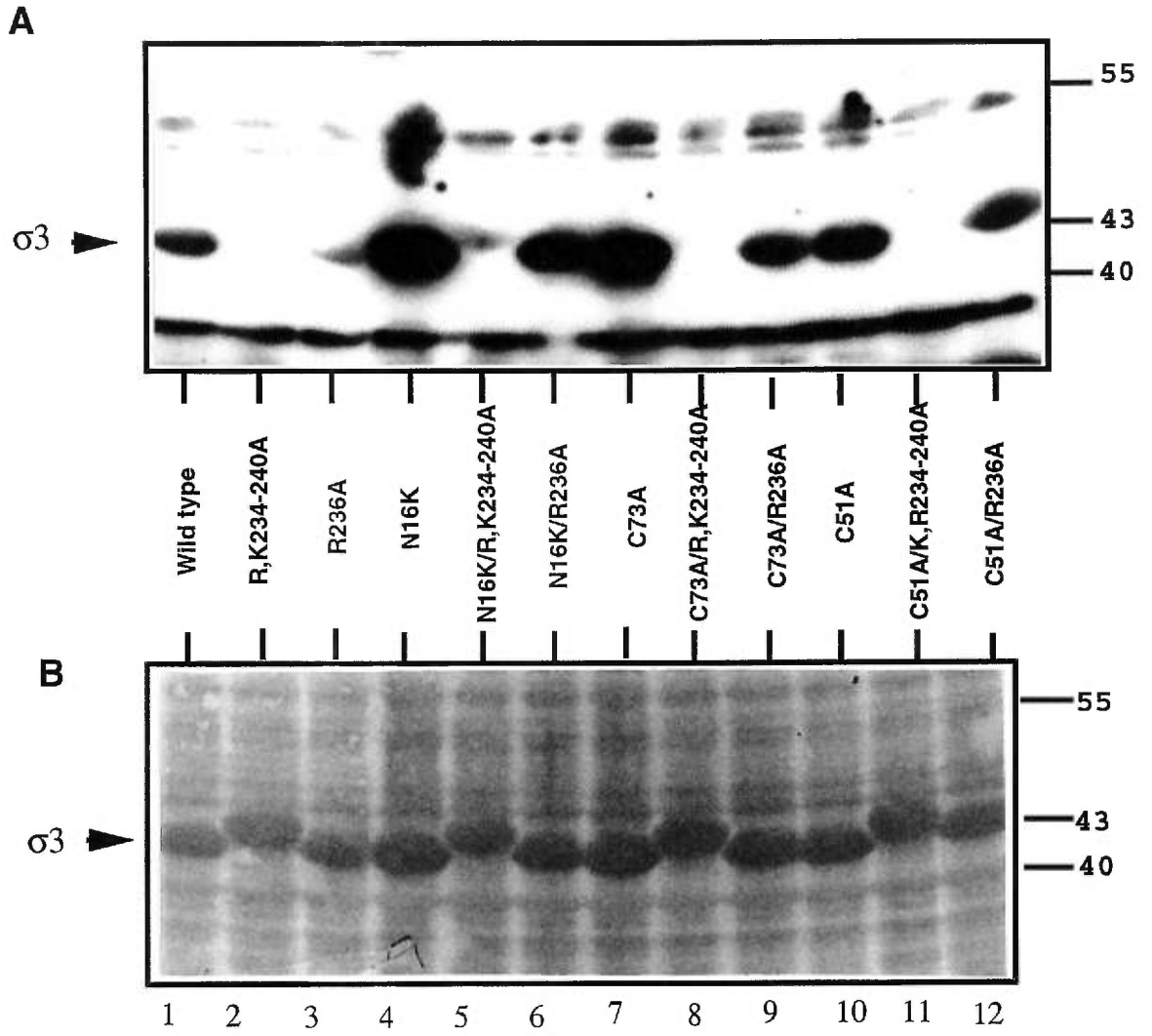


Figure 3. Zinc-binding ability of the $\sigma 3$ protein harboring the thermosensitive mutation (N16K).

COS-7 cells were transfected with 10 μ g of plasmid expression vector without insert (mock), or expression vectors encoding either wild-type $\sigma 3$ (wt), mutant N16K protein or zinc finger mutant (C73A), as negative control. Labeled COS-7 cells were lysed and protein extracts submitted to zinc-chelate affinity chromatography as described in Materials and Methods. Proteins were analyzed by SDS-PAGE followed by autoradiography. Panel A: aliquots of the starting material loaded onto the zinc column; panel B: proteins retained onto the column after washing at decreasing pH were eluted with acidic 0.2 M EDTA solution. The position of the $\sigma 3$ proteins is indicated.

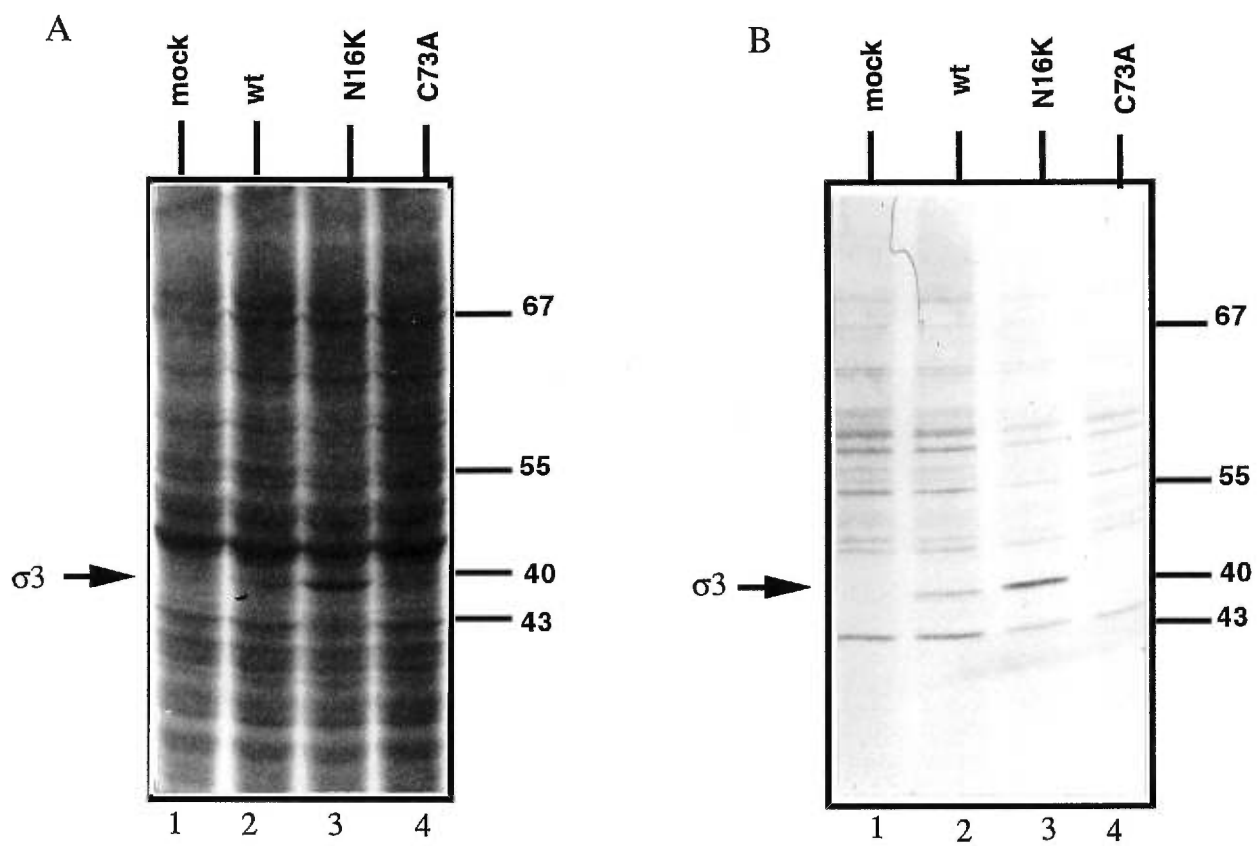


Figure 4. Subcellular localization of the wild-type and N16K $\sigma 3$ protein.

COS-7 cells were transfected with 10 μg of expression vector without insert (mock), or expression vectors encoding either wild-type $\sigma 3$ (S4) or mutant N16K protein. In $\sigma 3$ - $\mu 1$ co-expression experiments, COS-7 cells were transfected using 5 μg of those same plasmids together with 5 μg of $\mu 1$ expression vector (M2). Cell fractionation was done according to the procedure described in Materials and Methods. Abbreviations Cp, Cs and N refer to the cytoplasmic, cytoskeletal and nuclear fractions, respectively. Proteins were separated by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting using antireovirus antiserum. The positions of $\mu 1$, $\mu 1\text{C}$ and $\sigma 3$ proteins are indicated.

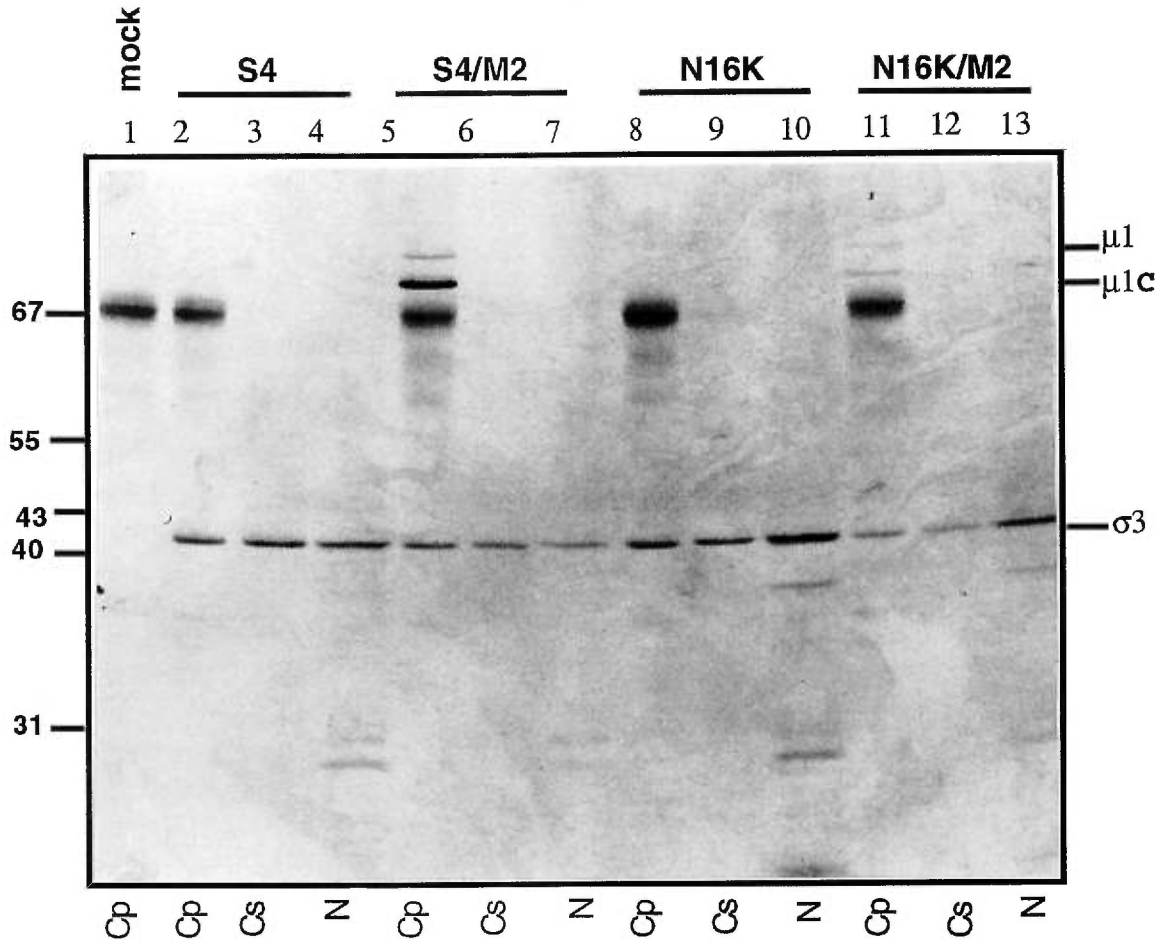
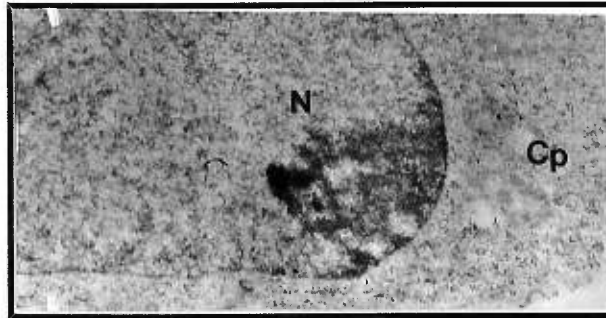


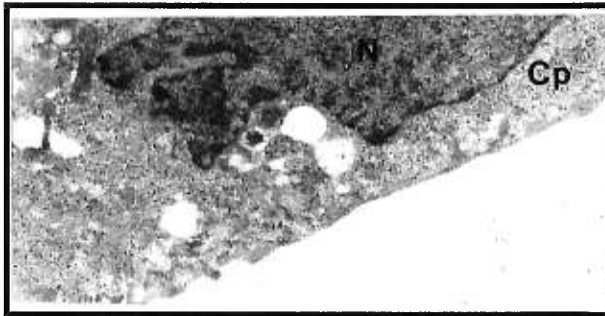
Figure 5. Immunoelectron microscopy localization of $\sigma 3$ protein.

Transfected or mock-transfected COS cells were examined by immunoelectron microscopy using monospecific anti- $\sigma 3$ antiserum and secondary gold-conjugated antibody as described in Materials and Methods. Panel A: mock-transfected cells with plasmid vector devoid of insert; panel B and D: cells transfected with wild-type $\sigma 3$ expression vector alone (B) or in co-transfection with $\mu 1$ expression vector (D); panel C and E: cells transfected with $\sigma 3$ N16K expression vector alone (C) or in co-transfection with $\mu 1$ expression vector (E).

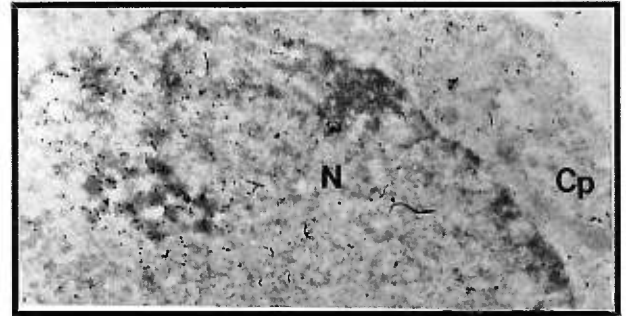
A Mock-transfected cells



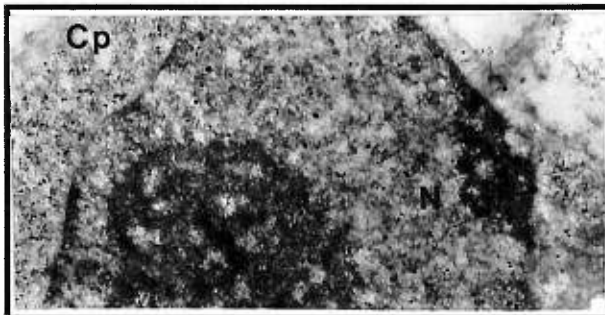
B Cells transfected with wild-type $\sigma 3$ expression vector



C Cells transfected with $\sigma 3$ N16K expression vector



D Cells co-transfected with wild-type $\sigma 3$ and $\mu 1$ expression vectors



E Cells co-transfected with $\sigma 3$ N16K and $\mu 1$ expression vectors

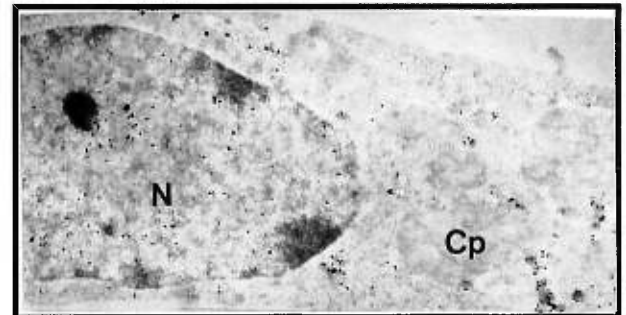


Figure 6. Effect of interferon on synthesis of viral proteins following infection of L929 cells with virions or ISVPs.

Panel A: Western immunoblotting using antireovirus antiserum. Samples of virions and ISVPs originating from wild-type (T3D) and ts453 viruses were generated by *in vitro* treatment of T3D and ts453 virions with chymotrypsin. The position of $\sigma 3$ and $\mu 1C$ cleavage product, δ , is indicated. Panel B and C: L929 cells were infected with virions or ISVPs at an MOI of 3 PFU/cell in the presence (+) or absence (-) of interferon treatment (250 IU/ml). Infections were carried out at permissive (32°C) and nonpermissive (37°C) temperatures. Viral protein synthesis was evaluated by metabolic radiolabeling followed by SDS-PAGE and autoradiography. Panel B: protein synthesis following infection with wild-type (T3D) virions and ISVPs. Panel C: protein synthesis following infection with ts453 virions and ISVPs. The positions of λ , $\mu 1$, $\mu 1C$ and $\sigma 3$ proteins are indicated.

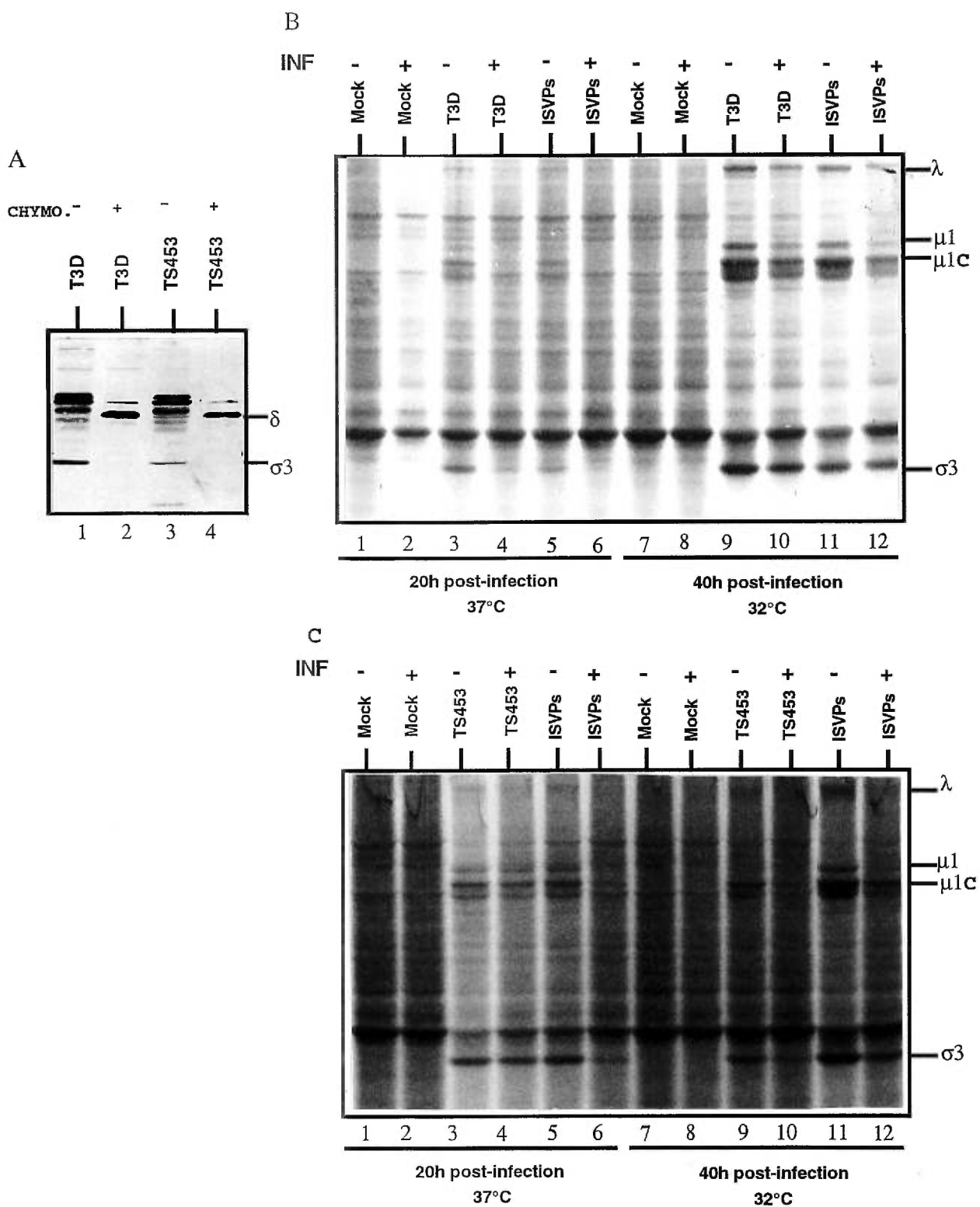
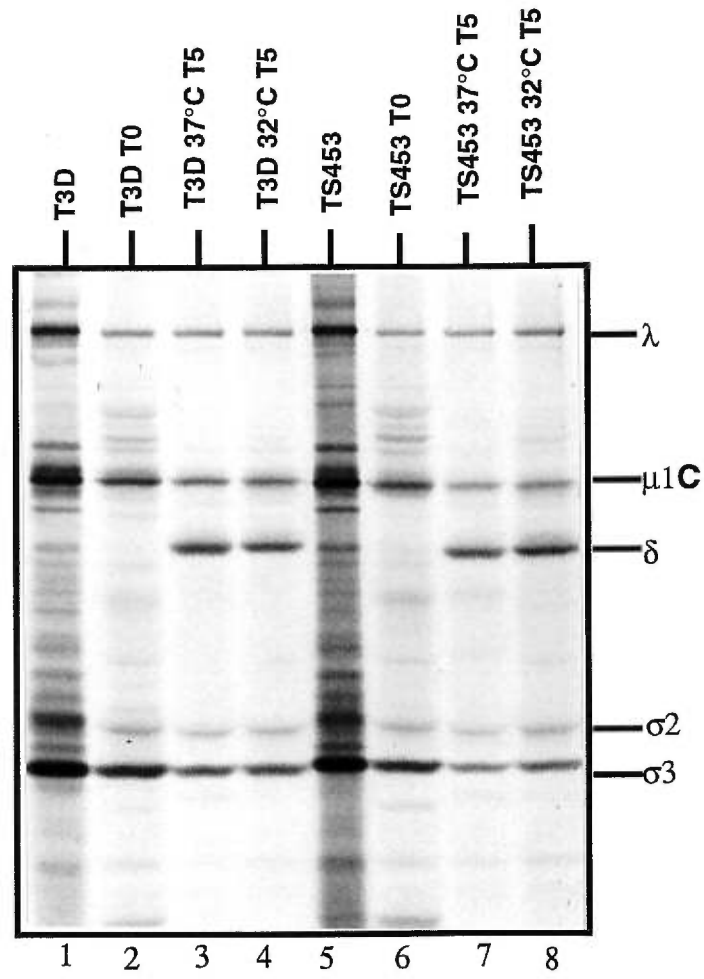


Figure 7. Uncoating efficiency of the ts453 virus. Radiolabeled wild-type (T3D) or ts453 virus was adsorbed onto L929 cells.

Radiolabeled viral proteins were then recovered immediately after the 1h adsorption period at 4°C or after 5h incubation at either permissive (32°C) or nonpermissive (37°C) temperatures. The positions of viral proteins λ , μ 1C, δ and σ 3 are indicated.



Chapitre 3

**Contributions au développement de systèmes
d'expression de protéines hétérologues à partir du
gène cloné codant pour la protéine $\sigma 3$ de réovirus**

Avant propos

Au cours de ma maîtrise j'ai participé à l'élaboration de systèmes d'expression additionnels dans le but de poursuivre la caractérisation de $\sigma 3$. Bien que les systèmes d'expression chez les bactéries et chez les cellules eucaryotes (cellules COS) aient contribué à mieux comprendre la relation entre la structure et la fonction de $\sigma 3$, ces systèmes présentent plusieurs inconvénients qui limitent l'avancement de l'étude de cette protéine. Le système d'expression chez la levure *Pichia pastoris* devait permettre la production d'une grande quantité de protéine soluble, tandis que le système permettant de contrôler les niveau d'expression de la protéine $\sigma 3$ devait aider à l'étude des effets biologiques suite à l'expression *in vivo* de la protéine dans des cellules de mammifères. Malgré le succès mitigé de ces systèmes, j'ai pu démontrer l'expression de $\sigma 3$ chez *Pichia pastoris* et chez les cellules SC1 de souris. Il devrait maintenant être possible d'optimiser la production de $\sigma 3$ dans la levure et/ou d'utiliser la lignée SC1 exprimant $\sigma 3$ pour compléter fonctionnellement un réovirus défectif au niveau du gène S4.

1. Introduction

Tel que déjà mentionné dans la revue de la littérature, la protéine $\sigma 3$ est impliquée dans la régulation de la synthèse protéique. Lors du cycle de multiplication des réovirus, on constate une transition graduelle de la synthèse des protéines cellulaires vers la synthèse des protéines virales. L'augmentation de la synthèse des protéines virales serait attribuable à $\sigma 3$ due à son effet stimulateur sur la traduction des ARNm viraux tardifs (Lemieux *et al.*, 1987). Cependant, cet effet ne serait pas dû à une interaction directe entre la protéine $\sigma 3$ et les ARNm tardifs (monocaténares) mais plutôt à une intervention de protéines issues de la machinerie traductionnelle de la cellule, ces dernières pouvant possiblement interagir avec $\sigma 3$. Cette hypothèse découle d'expériences démontrant que $\sigma 3$ se trouve en partie associée aux ribosomes de cellules infectées par réovirus (Lemay and Millward, 1986a; Lemieux *et al.*, 1987). Le motif de liaison au zinc présent dans la région amino-terminale de $\sigma 3$ pourrait bien être impliqué dans l'éventualité d'une interaction entre la protéine et une protéine cellulaire. L'affinité de la protéine pour l'ARN bicaténaire favorise également l'inhibition de la protéine kinase cellulaire ARN-dépendante (PKR); le processus d'activation de cette dernière constituant le principal mécanisme induit par l'interféron pour contrecarrer la multiplication des réovirus (Miyamoto and Samuel, 1980). Les progrès effectués en biologie moléculaire ont contribué, ces dernières années, à mieux définir le rôle de $\sigma 3$ au niveau traductionnel en permettant son expression à l'aide de systèmes procaryotes, eucaryotes et de traduction *in vitro*. Cependant, plusieurs inconvénients demeurent associés à de telles approches. Entre autres, le système

d'expression transitoire (cellules eucaryotes COS) employé jusqu'à maintenant donne un faible niveau d'expression de protéine soluble; ce niveau dépend de la capacité que présente les mutants de $\sigma 3$ à lier l'ARN bicaténaire et donc, de la capacité que présente ces mutants à inhiber PKR subséquentement à la transfection et, les mutants générés au niveau du domaine de fixation au zinc sont instables (Mabrouk *et al.*, 1995; Mabrouk and Lemay, 1994a). Pour sa part, le système bactérien permet un haut niveau d'expression de protéines sauvages et mutantes, mais synthétise des protéines $\sigma 3$ qui sont insolubles (Giantini and Shatkin, 1987; Miller and Samuel, 1992; Wang *et al.*, 1996), et ce malgré l'application de diverses méthodes visant à solubiliser la protéine. Néanmoins, d'importantes contributions à la compréhension de la structure et de la fonction de $\sigma 3$ ont pu être apportées par notre équipe à l'aide à ces deux systèmes d'expression: notamment, la caractérisation du domaine carboxy-terminal impliqué dans l'attachement à l'ARN bicaténaire, autant par essais sur filtre dans le cas de protéines insolubles que par chromatographie d'affinité dans le cas de protéines solubles (Mabrouk *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1996), et la découverte que le motif de liaison au zinc constituait un doigt de zinc de type CCHC (Mabrouk and Lemay, 1994a).

La protéine $\sigma 3$ est également impliquée dans le phénomène de persistance virale. Bien que le réovirus soit normalement lytique, il peut provoquer des infections persistantes dans une variété de cellules en culture. Certaines lignées cellulaires sont également plus enclines à l'établissement d'infections persistantes, notamment la lignée de fibroblastes SC1 de souris (Danis *et al.*, 1993b); chez cette lignée cellulaire, des

infections persistantes peuvent être rapidement établies même en utilisant des souches de réovirus propagées à de faibles multiplicités d'infection. Contrairement aux cellules L929, les cellules SC1 sont résistantes à l'inhibition de la synthèse protéique suite à une infection par réovirus, et sont également résistantes à l'effet antiviral induit par l'interféron (Danis *et al.*, 1993c; Danis *et al.*, submitted-a).

L'implication de la protéine $\sigma 3$ au niveau de la régulation de la synthèse protéique est donc considérable et sa capacité à lier l'ARN bicaténaire serait en partie responsable de ce phénomène subséquemment à une interruption du processus d'activation de la PKR. Il est également possible que les cellules SC1 soient affectées au niveau de la voie d'activation de la PKR, ce qui expliquerait le fait qu'elles soient résistantes à la réponse antivirale induite par l'interféron de même qu'à l'inhibition de la synthèse protéique. Cependant, afin de déterminer les coefficients de dissociation entre les complexes protéines-ARN, l'importance de la capacité de $\sigma 3$ à lier l'ARN bicaténaire lors de la stimulation des ARNm tardifs, et les possibilités d'interaction entre $\sigma 3$ et des protéines cellulaires, nous devons disposer d'une grande quantité de protéine soluble. Le système d'expression de protéines hétérologues utilisant la levure *Pichia pastoris* constituait donc un système idéal afin de produire une grande quantité de protéine soluble. En parallèle, l'établissement de lignées cellulaires permettant de contrôler l'expression de $\sigma 3$ constituait un modèle intéressant afin de comparer les cellules L929 et SC1 tant au niveau de la régulation traductionnelle qu'au niveau de la persistance virale.

2. Expression de σ^3 chez la levure *Pichia pastoris*

2.1 Principe du système d'expression chez *Pichia pastoris*

Le système d'expression de protéines hétérologues employant *Pichia pastoris* est relativement récent et a permis d'obtenir un haut niveau d'expression de protéines variées telles que la toxine tétanique, la cytokine TNF (Tumor Necrosis Factor), l'enveloppe du VIH (gp120) et l'antigène de surface de l'hépatite B (Clare *et al.*, 1991; Cregg *et al.*, 1987; Scorer *et al.*, 1993; Sreekrishna *et al.*, 1989). Ce système présente l'avantage des systèmes d'expression eucaryote en permettant toutes les modifications post-traductionnelles nécessaires au bon repliement de la protéine produite.

Pichia pastoris est une levure méthylotrrophe, donc capable de métaboliser le méthanol comme unique source de carbone pour sa croissance. La réaction biochimique nécessite l'utilisation d'oxygène moléculaire par l'alcool oxydase et a lieu au niveau des péroxysomes afin de protéger la levure contre la toxicité du peroxyde d'hydrogène généré au cours de la réaction (figure 1). Le système découle du fait que l'alcool oxydase a peu d'affinité pour l'oxygène. La levure compense donc cette défaillance en produisant une grande quantité de cette enzyme. Le promoteur utilisé pour l'expression de protéines hétérologues est justement celui contrôlant la production de l'alcool oxydase (Crane and Gould, 1994; Faber *et al.*, 1995; Wegner, 1990), ce qui permet un haut niveau d'expression de la protéine suite à une induction au méthanol.

2.2 Clonage du gène S4 codant pour $\sigma 3$ dans le vecteur d'expression pHIL-D2

Le gène S4, codant pour $\sigma 3$, a été cloné dans le vecteur d'expression pHIL-D2 (INVITROGEN), devant permettre l'accumulation intracellulaire de la protéine. Pour ce faire, le gène a été amplifié par PCR (Polymerase Chain Reaction) à l'aide de la Taq ADN-polymérase et en utilisant les réactifs provenant de la trousse 'Gene Amp™ DNA Amplification' de Perkin Elmer. Les séquences des oligonucléotides utilisés sont en 5' CCAGAATTCGTCGCAATGG et en 3' GATGAATTCAGCCTGTCCCACGTC. Les amorces visaient à introduire un site *EcoR*I à chacune des extrémités du gène S4; la séquence reconnue par l'enzyme étant soulignée. Le fragment obtenu a ensuite été digéré par *EcoR*I et sous-cloné au site unique du vecteur plasmidique pHIL-D2 pour générer le plasmide pHIL-S4. La nouvelle construction plasmidique a été soumise à une double digestion à l'aide des enzymes *Xho*I et *Tth*111I afin de vérifier que le gène S4 soit dans la bonne orientation par rapport au promoteur utilisé.

Le vecteur pHIL-S4 ne pouvant se répliquer dans les levures, ce dernier a été linéarisé soit avec *Sal*I, soit avec *Not*I afin de faciliter l'intégration de la cassette d'expression au sein du génome de *Pichia*. Cette cassette d'expression comprend notamment le gène S4 sous le contrôle du promoteur de l'alcool oxydase (AOX1), le signal de terminaison de la transcription du gène AOX1 et le gène HIS4 codant pour l'histidine déshydrogénase. Ainsi, l'intégration de la cassette d'expression se fait par recombinaison homologue entre les séquences en 5' et en 3' du gène AOX1 provenant du vecteur pHIL-S4, et celles faisant partie du génome de *Pichia*. Cette intégration

entraîne le remplacement du gène AOX1 par la cassette d'expression (figure 2). Par la suite, il est possible de sélectionner les levures recombinantes sur milieu sans histidine par complémentation génique. Ainsi, s'il y a recombinaison, la souche auxotrophe his4 sera complétementée par le gène HIS4 fourni par le vecteur plasmidique et pourra croître sur milieu minimal.

2.3 Production et purification de la protéine σ_3

La transformation des levures a été faite par électroporation en utilisant les procédures habituelles (Ausubel *et al.*, 1992b) et en utilisant une population de molécules obtenue suite à la digestion du vecteur pHIL-S4 (10 μ g d'ADN au total). Afin de vérifier s'il y a eu intégration du gène S4 dans le génome de *Pichia*, on a effectué un PCR à partir d'extraits d'ADN génomique provenant de nombreux recombinants. Les oligonucléotides utilisés visaient à amplifier la cassette d'expression, leurs séquences étant complémentaires aux portions en 5' et en 3' du gène AOX1.

Différents clones ont ensuite été retenus afin de vérifier l'expression de la protéine σ_3 . Pour ce faire, les souches ont d'abord été ensemencées dans un volume (10ml) de milieu minimal à base de glycérol (BMGY) et incubées à 30°C avec agitation constante. Le lendemain, afin d'induire l'expression de σ_3 , les levures ont été récupérées par centrifugation et resuspendues dans 4 volumes d'un milieu additionné de 0.5% de méthanol (BMMY). Lors de la croissance ou de l'induction des souches

de levures on a utilisé un milieu contenant du glycérol plutôt que du glucose car la présence de ce dernier réprime la transcription du gène AOX1. Un aliquot de 1ml fut récolté à tous les 12 heures d'induction, et ce pendant 96 heures. Un certain volume de méthanol a été ajouté à toutes les 24 heures afin de maintenir une concentration finale de 0.5%.

Les échantillons recueillis lors de l'induction ont été centrifugés et les culots resuspendus dans un tampon de lyse (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% SDS, 2% Triton X-100). Des billes de verres (0.55mm) ont également été ajoutées afin de favoriser l'éclatement des levures lors des agitations subséquentes sur plaque agitatrice (vortex). Suite à une brève centrifugation, un aliquot de chacun des surnageants fut déposé sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et réductrices (SDS-PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis). Les protéines ont ensuite été transférées sur membrane de nitrocellulose et la protéine $\sigma 3$ fut détectée par immunoempreinte à l'aide d'un sérum de lapin anti-réovirus (Lee Biomolecular) et d'un anticorps anti-immunoglobuline de lapin conjugué à la phosphatase alcaline (GIBCO/BRL) (Mabrouk and Lemay, 1994b). Des clones présentant le gène S4 intégré dans le génome de *Pichia*, environ 70% d'entre eux produisaient la protéine à un niveau détectable par immunoempreinte, le pic de production de la protéine $\sigma 3$ survenant entre 48 et 72 heures post-induction (exemple en figure 3). Bien qu'il soit connu que les niveaux d'expression varient selon le nombre de copies du gène intégrées au sein du génome de la levure, l'efficacité de synthèse de la protéine $\sigma 3$ semblait similaire pour tous les clones.

Suite au criblage des différents clones, un d'entre eux a été sélectionné afin d'optimiser la production de $\sigma 3$. Cette souche a donc été inoculée et induite selon la même procédure que précédemment en augmentant les volumes de la première et deuxième inoculation à 250 ml et 1 000 ml, et en utilisant des erlenmeyers pourvus de rainures afin de permettre une meilleure oxygénation des levures. Après 72 heures d'induction, les levures ont été récupérées par centrifugation et resuspendues dans 80 ml de tampon de lyse. Un volume égal de billes de verre a ensuite été ajouté et les levures furent homogénéisées mécaniquement (Braun, Elektromotoren Werke Kaiser, 60 Hertz). Après centrifugation, le surnageant contenant la protéine $\sigma 3$ fut recueilli.

Étant donné que $\sigma 3$ est une métalloprotéine à zinc, il a été possible d'obtenir une fraction relativement pure de la protéine, en procédant à une chromatographie d'affinité sur colonne de zinc (Boehringer-Mannheim). Cette chromatographie est basée sur le fait que les protéines démontrant une région riche en résidus cystéine et histidine sont retenues par les ions de zinc (Porath *et al.*, 1975). Pour ce faire, le surnageant recueilli après homogénéisation a premièrement été précipité à l'aide de 15% de sulfate d'ammonium afin de concentrer la protéine $\sigma 3$. Les protéines ayant précipité suite à ce traitement furent récupérées par centrifugation, resuspendues dans 20 ml de tampon-colonne (50mM Tris-HCl [pH 8.0], 150mM NaCl) additionné de 0.1 % de NP-40, et passées sur colonne; le débit de celle-ci a été contrôlé pour que l'extrait protéique circule lentement entre la matrice. Afin de libérer la colonne des protéines ayant lié les ions de zinc de façon non spécifique, la colonne fut rincée successivement avec du tampon-colonne contenant 150mM et 800mM de NaCl. Une

élution sélective a ensuite été effectuée à l'aide d'un gradient décroissant de pH [pH 7.5, 7.0, 6.5, 6.0 et 5.5] en utilisant 0.1M de NaPO_4 et 800mM de NaCl (Eagle and Klessig, 1992). Tel que démontré par une coloration des protéines au nitrate d'argent (figure 4), on obtient une fraction relativement enrichie en $\sigma 3$ suite à l'élution finale de la colonne avec 0.2M d'EDTA pH6.0; il est connu que les interactions spécifiques avec les ions de zinc sont supprimées en conditions acides.

Nous avons donc démontré qu'il était possible d'exprimer la protéine $\sigma 3$ de réovirus sous forme soluble en utilisant le système d'expression chez *Pichia pastoris* et qu'il était possible d'enrichir la protéine en procédant à une purification en deux étapes. Les propriétés de la protéine produite sont également préservées; en plus de maintenir son affinité pour le zinc, elle est capable de lier l'ARN bicaténaire dans un test de chromatographie d'affinité utilisant du poly(IC)-agarose (résultats non présentés). Cependant, les niveaux d'expression sont faibles, ce qui risque de compliquer les analyses biochimiques anticipées. La quantité de protéine synthétisée est estimée à 100 $\mu\text{g/L}$ de culture et, subséquemment aux procédures de purification, le niveau de production en protéine $\sigma 3$ peut être évalué à environ 5 $\mu\text{g/ml}$ de culture.

3. Établissement de lignées cellulaires permettant le contrôle du niveau d'expression de σ_3

3.1 Principe du système exprimant des protéines hétérologues de façon régulée

L'intérêt pour l'établissement de lignées cellulaires exprimant des protéines hétérologues de manière régulée est grandissant, surtout depuis la venue du nouveau système d'expression utilisant les éléments régulateurs de l'opéron tétracycline provenant du transposon 10 (Tn10) de *E. coli* (Gossen *et al.*, 1993; Gossen and Bujard, 1992; Gossen *et al.*, 1995). Le contrôle de l'expression génique dans ces lignées cellulaires est donc modulé par la présence ou l'absence de tétracycline dans le milieu de culture. Ce système nécessite la présence de deux composantes, soit la protéine transactivatrice (tTA) et le gène d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur minimal (CMV) joint à des séquences de l'opérateur tétracycline. La protéine transactivatrice possède à son tour deux domaines fusionnés l'un à l'autre: un domaine amino-terminal liant l'ADN du répresseur tétracycline (tetR) et un domaine carboxy-terminal d'activation transcriptionnel provenant du virus herpes simplex (VP16). Ce transactivateur chimérique est exprimé de façon constitutive et stimule la transcription du gène d'intérêt grâce à la présence de séquences de l'opérateur tétracycline (tetO) en amont du promoteur.

Le système tire avantage des propriétés du répresseur tétracycline, lequel est spécifique à son opérateur et démontre une grande affinité pour son effecteur, soit la tétracycline. Ainsi, en présence de tétracycline, la protéine transactivatrice est inactive

suite à un changement conformationnel de la portion tetR, ce qui l'empêche de se fixer à son opérateur. Par contre, lorsque l'on retire la tétracycline, la protéine transactivatrice est en mesure de stimuler la transcription du gène d'intérêt placé sous le contrôle du promoteur minimal. Le fonctionnement du système est résumé à la figure 5.

Nous avons choisi d'établir des lignées cellulaires L929 et SC1 de souris pouvant exprimer $\sigma 3$ de manière induite. Des travaux antérieurs avaient démontré la possibilité d'établir une lignée de cellules L929 exprimant $\sigma 3$ de façon constitutive en utilisant le promoteur SV40, et ce sans affecter particulièrement le taux de croissance de ces cellules (Lemay and Millward, 1986b). Bien que les niveaux d'expression aient été faibles probablement à cause d'une toxicité de la protéine $\sigma 3$ lorsqu'exprimée de façon constitutive, les chances d'établir des lignées cellulaires permettant de contrôler l'expression de $\sigma 3$ s'avéraient donc bonnes.

3.2 Première étape: expression de la protéine transactivatrice

Les lignées cellulaires L929 et SC1 ont été entretenues en culture cellulaire selon les méthodes habituelles et maintenues dans du milieu MEM (Minimum Essential Medium) additionné de glutamine. Les antibiotiques (hygromycine et/ou G418) furent ajoutés au besoin pour la sélection des cellules portant les plasmides codant soit pour la tTA, soit pour $\sigma 3$. Une concentration de 2 μ g/ml de tétracycline a été utilisée en condition de non-induction.

Ainsi, dans un premier temps, les cellules L929 et SC1 ont été transfectées selon la méthode au phosphate de calcium avec le plasmide codant pour la protéine transactivatrice (pREP4-tTA) (Ausubel *et al.*, 1992a), le vecteur tTA ayant été offert par le laboratoire du Dr. Éric A. Cohen (Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal). Étant donné que le plasmide possède le gène de résistance à l'hygromycine, les cellules transfectées furent mises sous sélection pendant une période de 12 jours à l'aide d'une concentration pré-établie de 380 μ g/ml et 210 μ g/ml d'hygromycine pour les cellules L929 et SC1 respectivement. Une technique rapide pour isoler des clones cellulaires consiste à utiliser des disques de papier Watman 3MM imbibés de trypsine 0.25% (Gibco/BRL). Ces derniers sont appliqués sur les clones qui peuvent ensuite être repiqués dans des plaques à 24 puits (Domann and Martinez, 1995). Une douzaine de clones de chacune des lignées ont été retenus afin de tester leur efficacité à exprimer la protéine transactivatrice. Pour ce faire, nous avons choisi un test basé sur le potentiel de la protéine transactivatrice à stimuler, en absence de tétracycline, l'expression du gène rapporteur de la chloramphénicol acétyl-transférase (CAT) placé sous le contrôle du promoteur possédant les séquences tetO. Il a donc été possible de déterminer lequel des clones exprimait le mieux la protéine transactivatrice, en procédant à des essais de détermination de l'activité CAT (figure 6). Les clones cellulaires ont été récupérés 48 heures post-transfection et les produits acétylés, marqués au ^{14}C , furent séparés par chromatographie en couche mince.

Les résultats des essais CAT ont démontré qu'il y avait une différence au niveau du degré d'expression de la protéine transactivatrice, entre les deux lignées cellulaires. En effet, la capacité du transactivateur chimérique à promouvoir l'expression du gène CAT est plus grande chez les cellules SC1 que chez les cellules L929; ce qui confirme de récents résultats démontrant que le type cellulaire influence l'efficacité d'expression de la protéine transactivatrice (Aukland-Berglund and Leib, 1995). Néanmoins, le clone L929 et le clone SC1 présentant une forte activité CAT ont été sélectionnés afin de procéder à la prochaine étape de transfection utilisant, cette fois, le vecteur codant pour $\sigma 3$ (pREP9-S4).

3.3 Deuxième étape: expression de la protéine $\sigma 3$

Ainsi, les clones L929 et SC1 sélectionnés furent transfectés à l'aide du vecteur codant pour $\sigma 3$. Suite à la transfection, une autre série de clones fut sélectionnée en présence de néomycine (G418); soit en présence de 500 $\mu\text{g/ml}$ d'antibiotique pour les cellules L929 et de 175 $\mu\text{g/ml}$ pour les cellules SC1. Après environ cinq passages, les différents clones ont été analysés afin de vérifier l'expression de $\sigma 3$ en conditions d'induction.

Afin de procéder à l'immunoprécipitation, les cellules ont étéensemencées à une concentration de 5×10^5 cellules par Pétri de 10cm de diamètre. Suite à leur attachement au support solide, elles furent rincées plusieurs fois au PBS (Phosphate-Buffered Saline) afin d'enlever toutes traces de tétracycline. Le marquage métabolique

a ensuite été effectué 48 heures plus tard. Subséquemment à une période de carence en méthionine (milieu sans méthionine), la méthionine marquée (^{35}S) fut ajoutée afin d'obtenir une concentration finale de $50\mu\text{Ci/ml}$. Après un marquage de 12 heures, les cellules ont été récupérées et resuspendues dans un tampon Ripa (140mM NaCl , $8\text{mM Na}_2\text{HPO}_4$, $8\text{mM NaH}_2\text{PO}_4$, 1% NP-40, 0.5% déoxycholate de sodium et 0.05% de SDS). Un tiers du surnageant obtenu suite à la lyse cellulaire fut utilisé pour l'immunoprécipitation. Les extraits protéiques ont premièrement été mis en contact avec l'antisérum anti-réovirus pendant 16 heures à 4°C , et furent précipités 1 heure à 4°C avec la protéine A sépharose. Les billes de sépharose ont ensuite été rincées et les protéines immunoprécipitées furent décrochées à l'aide du tampon Laemmli (Laemmli, 1970). Les protéines marquées ont alors été séparées sur gel SDS-PAGE et exposées sur film Kodak XAR.

Les résultats des autoradiographies démontrent la présence d'un clone SC1-tTA/S4 qui exprime la protéine $\sigma 3$ à un niveau appréciable (figure 7). Par contre, des clones L929-tTA/S4 testés, aucun n'exprimait $\sigma 3$ à un niveau détectable par immunoprécipitation. Il y aurait donc une corrélation entre l'efficacité à exprimer la protéine transactivatrice et le potentiel à synthétiser la protéine d'intérêt.

Étant donné qu'il fut impossible d'établir une lignée de cellules L929 pouvant exprimer $\sigma 3$ à l'aide de ce système, les études comparatives visant à déterminer l'effet de l'interféron sur ces lignées et à approfondir le rôle anti-PKR de $\sigma 3$ n'ont pu être effectuées. Toutefois il fut impossible d'établir la persistance virale dans les cellules SC1 exprimant $\sigma 3$ (SC1-tTA/S4), alors qu'il est connu que les cellules SC1 sont

facilement rendues persistantes suite à une infection par réovirus (Danis *et al.*, 1993c). Le même phénomène fut observé tant en présence qu'en absence de tétracycline. Une courbe de croissance comparant des cellules SC1 parentales, des SC1 exprimant uniquement la protéine transactivatrice et des cellules SC1-tTA/S4 induites et non-induites, démontre également un comportement similaire pour les cellules SC1-tTA/S4 induites et non-induites (résultats non présentés). Ces dernières observations semblent donc indiquer qu'une infime production de $\sigma 3$ dans ces cellules est suffisante afin d'exercer une fonction biologique et nuire à l'établissement de la persistance virale.

De récents résultats publiés par Yue et Shatkin démontrent la possibilité d'établir une lignée de cellules HeLa (carcinome humain) pouvant exprimer $\sigma 3$ de façon induite (Yue and Shatkin, 1996). La protéine produite s'avère également stable pour une période de 24 heures. Le système permettant de contrôler les niveaux d'expression de protéines hétérologues ayant été décrit pour la première fois à l'aide des cellules HeLa, la possibilité d'exprimer $\sigma 3$ dans ces cellules était donc prévisible. Le fait que nous ayons réussi à établir une lignée pouvant exprimer $\sigma 3$ de façon régulée seulement dans les cellules SC1, indique que le bon fonctionnement d'un tel système dépend en grande partie du type cellulaire. Le manque de consistance d'un type cellulaire à l'autre pourrait être attribuable à une toxicité du transactivateur chimérique et/ou à une perte de ce dernier car le vecteur codant pour la protéine transactivatrice, tout comme celui codant pour la protéine d'intérêt, existe sous forme épisomale. Finalement, nos résultats confirment un problème d'étanchéité du système faisant en

sorte qu'il y ait, malgré une absence d'induction, synthèse de la protéine (Aukland-Berglund and Leib, 1995). Afin de remédier à ces inconvénients, un nouveau système a été adopté qui permet de contrôler les niveaux d'expression du transactivateur chimérique (Shockett *et al.*, 1995). Chez ce modèle, le promoteur (CMV) contrôlant l'expression de la protéine transactivatrice est combiné à des séquences tetO, ce qui permet une autorégulation de celle-ci. Malgré le fait que nous ayons en plus choisi d'utiliser un vecteur tTA capable de s'intégrer au sein du génome cellulaire, les résultats préliminaires employant ce nouveau transactivateur chimérique ne semblent pas vraiment indiquer une amélioration des niveaux d'expression de la protéine transactivatrice (résultats non présentés).

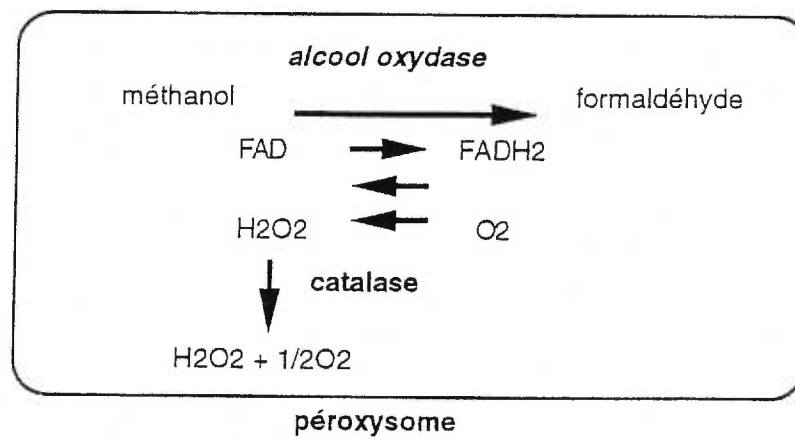


Figure 1. Voie métabolique du méthanol à l'intérieur des péroxysomes de *Pichia pastoris*.

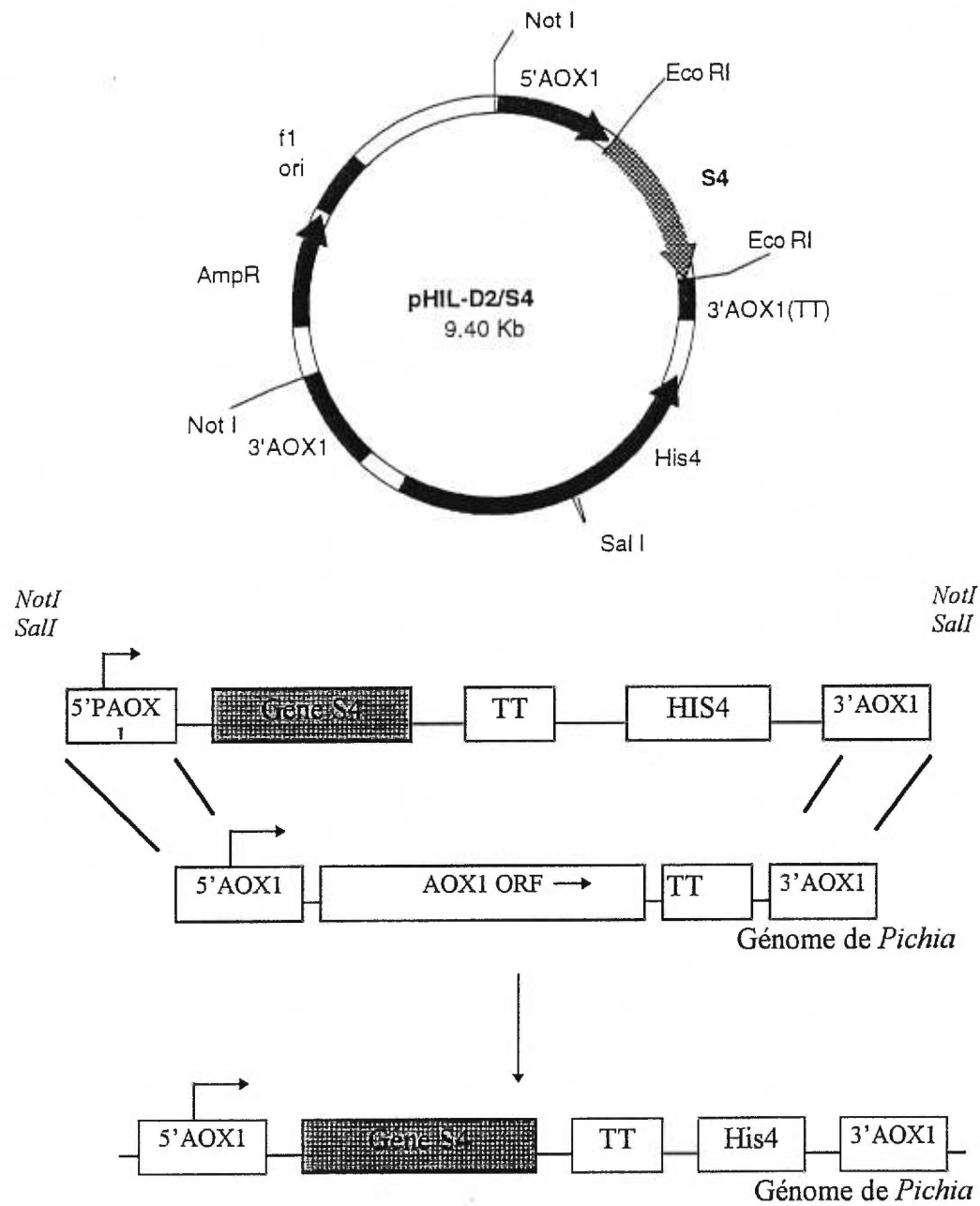


Figure 2. Exemple d'un événement de recombinaison permettant l'intégration du gène S4 dans le génome de *Pichia pastoris*.

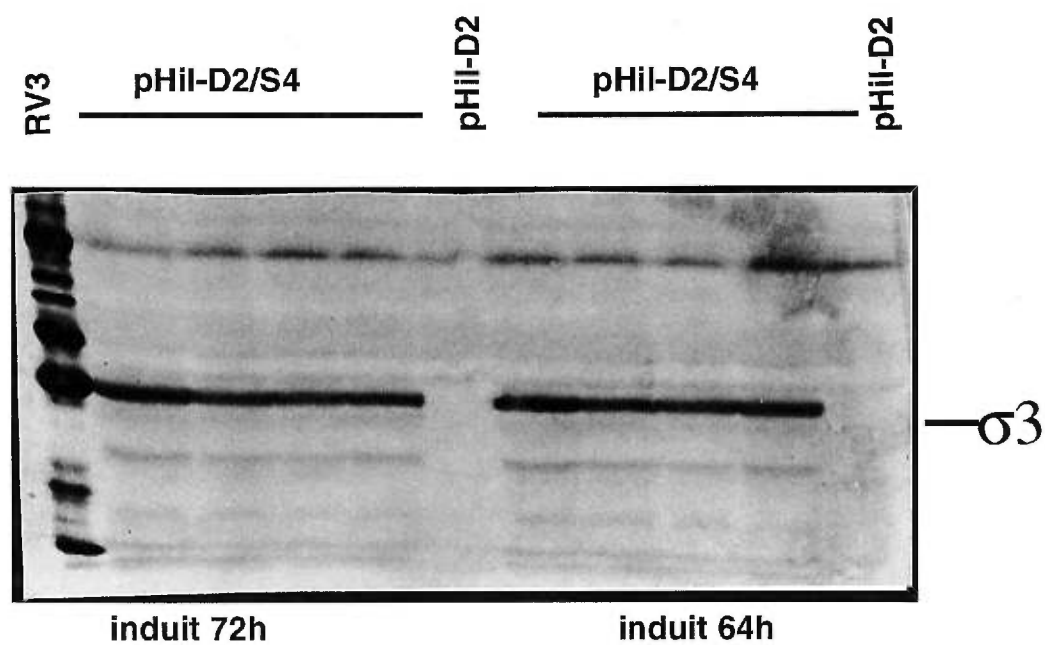


Figure 3. Immunoempreinte d'extraits protéiques provenant de divers recombinants de levure à l'aide d'un sérum antiréovirus de lapin. Suite au lavage de la membrane, un anticorps anti-immunoglobuline (IgG) de lapin couplé à la phosphatase alcaline a permis la détection de la protéines $\sigma 3$ chez plusieurs clones de levure.

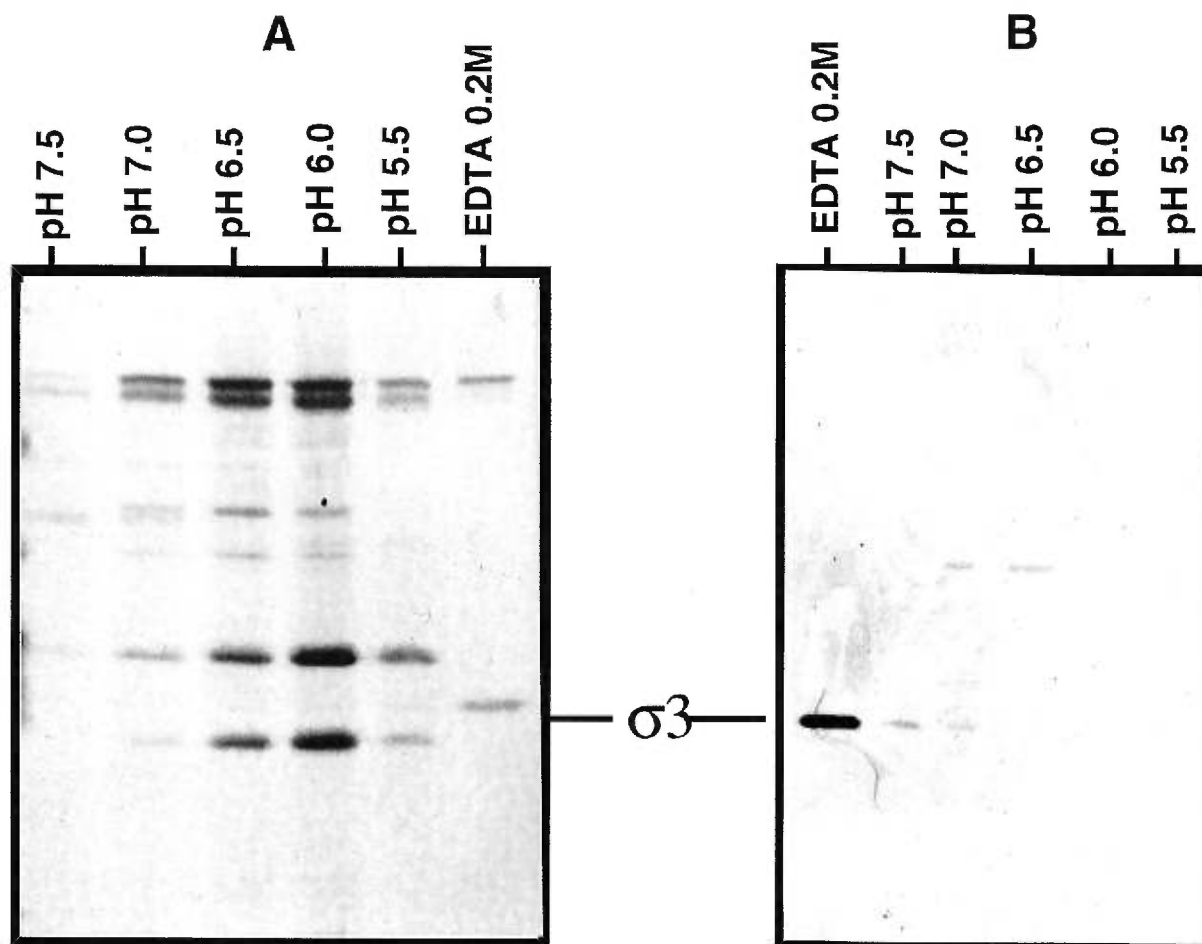


Figure 4. Purification sur résine de zinc d'un extrait protéique provenant d'un clone de levure exprimant $\sigma 3$. Suite à une élution sélective à l'aide d'un gradient de pH, on récupère la protéine $\sigma 3$ dans la fraction EDTA. A: Coloration au nitrate d'argent. B: Immunoempreinte utilisant un sérum antiréovirus.

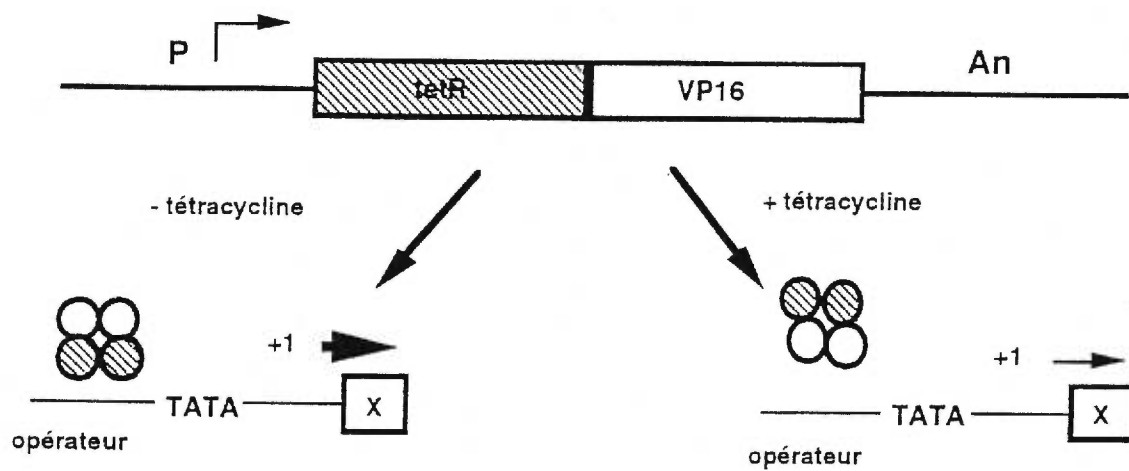


Figure 5. Système permettant de contrôler les niveaux d'expression de protéines hétérologues.

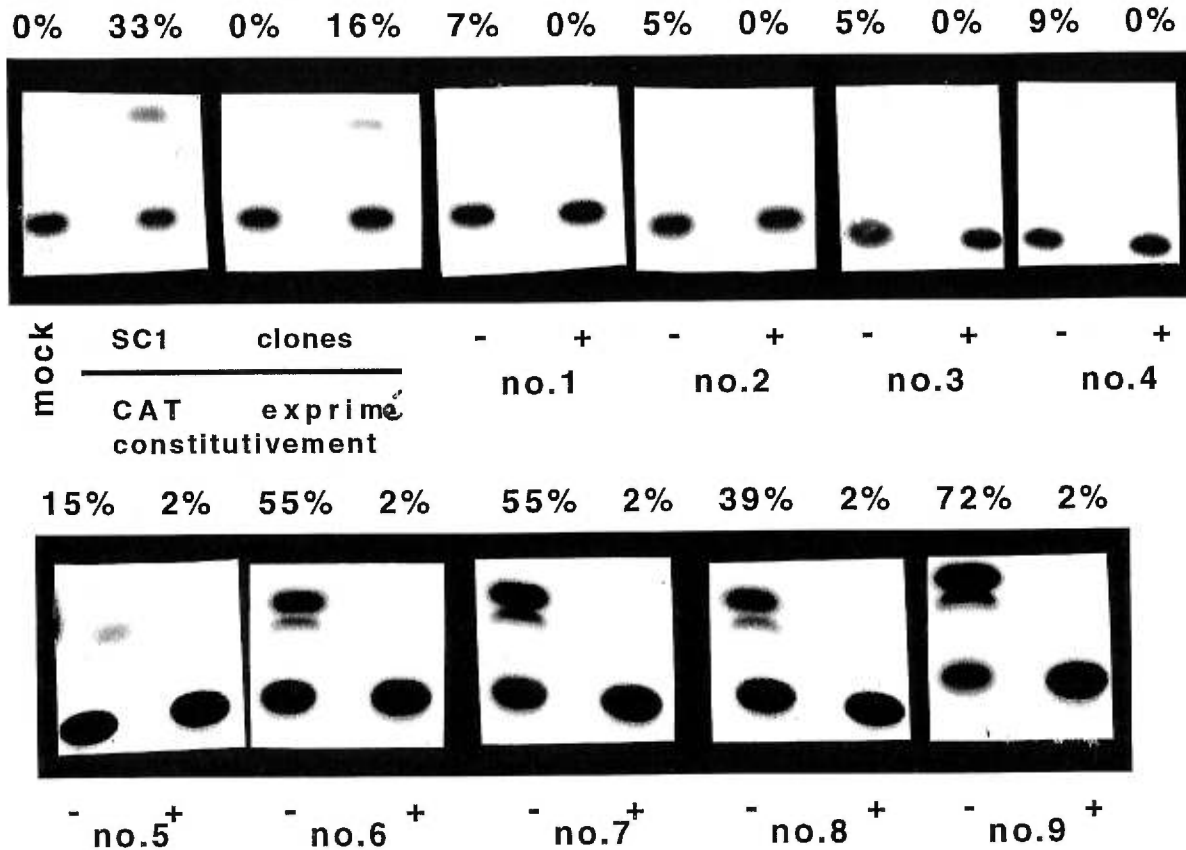


Figure 6. Pourcentage d'activité CAT de différents clones SC1 exprimant la protéine transactivatrice (tTA) en présence et en absence de tétracycline. Le clone no. 9 a été sélectionné en raison de son haut niveau d'activité CAT et de son faible niveau basal. Le pourcentage d'activité CAT est également démontré pour des cellules SC1 parentales et pour des clones SC1 exprimant la tTA suite à la transfection d'un vecteur permettant l'expression constitutive de la protéine CAT. Contrôle négatif (*mock*): cellules SC1 non transfectées

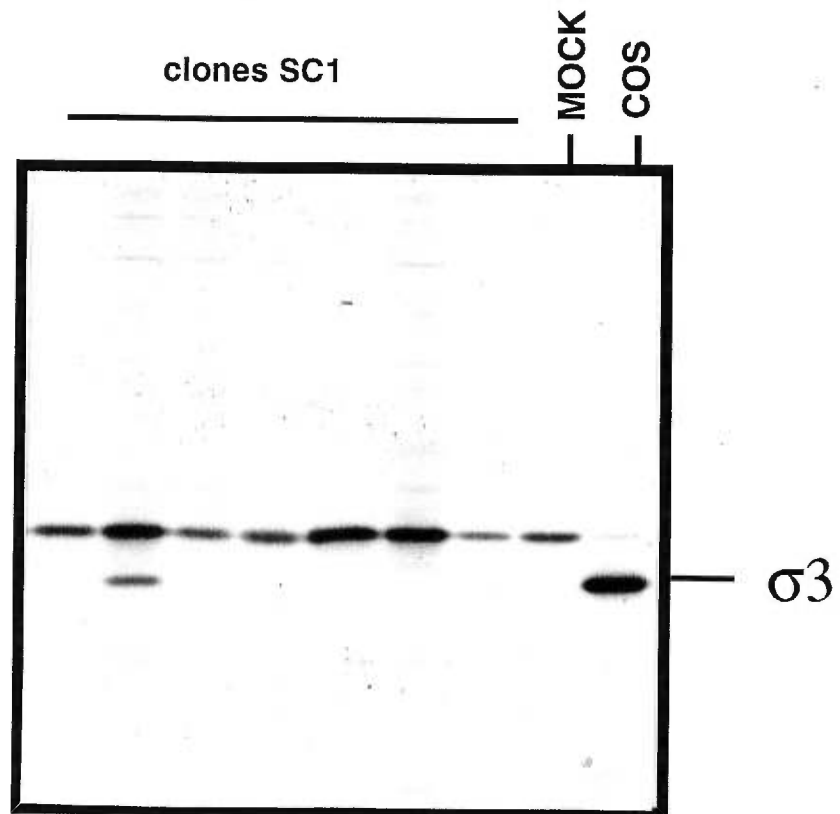


Figure 7. Immunoprécipitation de différents clones SC1 exprimant la protéine transactivatrice (tTA) et transfectés avec le vecteur codant pour la protéine $\sigma 3$. Les clones ont été analysés suite à un marquage métabolique en absence de tétracycline. Contrôle positif: Cellules COS exprimant de façon constitutive la protéine $\sigma 3$. Contrôle négatif (mock): Cellules SC1 exprimant uniquement la protéine transactivatrice.

Chapitre 4

Discussion

Mon étude a porté essentiellement sur la protéine $\sigma 3$ de réovirus. En plus de constituer une des protéines majeures de la capsid externe des réovirions, la protéine $\sigma 3$ remplit plusieurs fonctions lors du cycle de multiplication viral. Elle serait impliquée dans l'inhibition de la synthèse protéique de la cellule hôte (Sharpe and Fields, 1981a), la stimulation de la traduction des ARNm viraux tardifs (Lemieux *et al.*, 1987), l'établissement et le maintien d'infections persistantes (Ahmed and Fields, 1982; Sharpe and Fields, 1983) et l'inhibition de l'action antivirale induite par l'interféron (Imani and Jacobs, 1988; Samuel, 1991). L'association des protéines $\mu 1$ et $\sigma 3$ étant nécessaire à la formation de la capsid externe, il est possible que cette interaction influence le rôle fonctionnel de la protéine $\sigma 3$ (Huisman and Joklik, 1976; Tillotson and Shatkin, 1992).

Les différentes propriétés de la protéine $\sigma 3$ sont conférées par la présence de deux domaines distincts. La région carboxy-terminale de $\sigma 3$ permet à la protéine de lier l'ARN bicaténaire, activateur de PKR, tandis que la région amino-terminale contient un motif de liaison au zinc. Le domaine amino-terminal serait responsable d'interactions protéine-protéine ($\sigma 3$ - $\mu 1$) (Danis *et al.*, 1992; Mabrouk and Lemay, 1994b; Shepard *et al.*, 1996), et contrôlerait le degré d'affinité de la protéine pour l'ARN bicaténaire (Schiff *et al.*, 1988; Wang *et al.*, 1996). En effet, l'élimination de la région amino-terminale de $\sigma 3$ contribue à augmenter l'affinité de la protéine pour l'ARN bicaténaire.

Nous avons donc profité de l'existence d'un réovirus thermosensible (ts453) afin de déterminer s'il y avait une relation entre l'efficacité de la protéine $\sigma 3$ à lier

l'ARN bicaténaire et le degré de résistance du virus à l'action antivirale de l'interféron. Le virus ts453 possède une protéine $\sigma 3$ altérée et, lorsque propagé à température non-permissive (37°C), présente une défectuosité au niveau de l'assemblage de la capside externe. La caractérisation de ce virus a permis d'identifier une mutation non-conservative (N16K) dans le domaine amino-terminal de la protéine $\sigma 3$ (Danis *et al.*, 1992). Cette substitution a pour conséquence d'introduire un acide aminé basique dans une région passablement acide de la protéine, et de nuire à l'interaction de $\sigma 3$ avec $\mu 1$; suite à une co-expression, dans les cellules COS, de la protéine $\mu 1$ et de la protéine $\sigma 3$ N16K, il y a absence d'accumulation de $\mu 1C$ (Mabrouk and Lemay, 1994b). Il est connu que la protéine $\sigma 3$ doit s'associer à $\mu 1$ afin de permettre le clivage de $\mu 1$ en $\mu 1C$ (Mabrouk and Lemay, 1994b; Tillotson and Shatkin, 1992).

Ainsi, le travail présenté dans l'article (chapitre 2) regroupe des résultats obtenus suite à la production de protéines $\sigma 3$ recombinantes à l'aide de systèmes d'expression bactérien (attachement à l'ARN) et eucaryote (affinité pour le zinc, localisation intracellulaire), de même que des résultats provenant du modèle d'infection de cellules L929 par le réovirus ts453 (effets de l'interféron). L'ensemble de ces résultats démontre l'importance de la région amino-terminale de la protéine $\sigma 3$ dans son interaction avec $\mu 1$, et son implication dans la régulation du degré d'affinité de la protéine pour l'ARN bicaténaire. Le domaine amino-terminal de $\sigma 3$ pourrait donc influencer le processus d'activation de la PKR en réponse à une stimulation par l'interféron.

Tel que mentionné dans la revue de la littérature, l'affinité de la protéine σ_3 pour l'ARN bicaténaire est attribuable à la présence de deux motifs basiques dans la région carboxy-terminale de la protéine. Selon des analyses algorithmiques exécutées par ordinateur, ces deux motifs sont enclins à adopter une structure en hélice- α . À mon arrivée au laboratoire j'ai participé à des études avec des protéines σ_3 entières ou dépourvues de la région amino-terminale subséquemment à une digestion protéolytique de la protéine. Ces études ont révélées que le deuxième motif du domaine carboxy-terminal était plus important que le premier lors d'interactions de la protéine avec l'ARN bicaténaire. Contrairement à la situation observée avec la protéine σ_3 pleine longueur, le premier motif basique intervient très peu dans l'attachement de la protéine tronquée à l'ARN bicaténaire, d'où l'hypothèse voulant que le rôle du premier motif soit de prévenir l'effet inhibiteur de la région amino-terminale de σ_3 sur la fonction d'attachement de la protéine à l'ARN bicaténaire (Wang *et al.*, 1996).

Afin de déterminer les effets de la région amino-terminale de σ_3 sur l'affinité de la protéine pour l'ARN bicaténaire, nous avons construit des vecteurs plasmidiques combinant soit la mutation correspondant au virus ts453 (N16K), soit des mutations altérant le motif de liaison au zinc (C51A, C73A), avec des mutations affectant le premier motif carboxy-terminal de la protéine (R, K234-240A, R236A). Les protéines σ_3 furent exprimées dans la bactérie, plutôt que dans les cellules COS car, dans ces dernières, les protéines mutées se sont avérées instables ou faiblement exprimées (Mabrouk *et al.*, 1995; Mabrouk and Lemay, 1994a).

Les essais sur filtre présentés dans ce travail, démontrent que la mutation N16K, de même que les mutations affectant le motif à doigt de zinc, peuvent augmenter l'affinité de la protéine $\sigma 3$ pour l'ARN bicaténaire. Les protéines recombinantes renfermant des mutations dans la région amino-terminale conjointement avec des mutations altérant le premier motif basique du domaine carboxy-terminal de $\sigma 3$ (mutants-doubles de $\sigma 3$), possèdent également une plus grande affinité pour l'ARN bicaténaire, comparativement aux mutants affectés uniquement au niveau de la région carboxy-terminale de la protéine (mutants-simples de $\sigma 3$: R, K234-240A, R236A). Ainsi, le rôle du premier motif carboxy-terminal est négligeable non seulement lorsqu'on élimine le domaine amino-terminal (travaux antérieurs), mais également lorsqu'on substitue des acides aminés localisés près du motif de liaison au zinc ou participant à la coordination du zinc. Cette observation est importante car il est possible que de telles substitutions puissent exister dans certaines souches de réovirus (Kedl *et al.*, 1995; Schmechel *et al.*, 1997). Étant donné que le premier motif présente une plus faible probabilité d'adopter une structure en hélice- α que le deuxième motif, et qu'il présente moins de similitudes avec les motifs basiques correspondant à d'autres protéines pouvant lier l'ARN bicaténaire, nos résultats sont en accord avec l'hypothèse voulant que le rôle principal du premier motif carboxy-terminal de $\sigma 3$ soit d'atténuer l'effet inhibiteur du domaine amino-terminal.

La mutation correspondant au virus ts453 augmente l'affinité de $\sigma 3$ pour l'ARN bicaténaire au même titre que les mutations exercées au niveau du doigt de zinc. Cependant, contrairement aux substitutions affectant la coordination du zinc, la

substitution N16K n'altère pas la capacité de lier le zinc. En effet, la chromatographie d'affinité indique que la protéine $\sigma 3$ N16K lie les atomes de zinc avec le même degré d'affinité que la protéine $\sigma 3$ de type sauvage; suite à une élution sélective de la colonne de zinc en procédant à un gradient de pH, la protéine mutante N16K demeure toujours attachée à la matrice pour n'être éluee qu'avec la solution chélatrice (EDTA). L'effet induit sur le degré d'affinité à l'ARN bicaténaire, serait donc davantage associé à un changement conformationnel de la protéine $\sigma 3$ suite aux mutations exercées dans la région amino-terminale de la protéine. Les motifs à doigt de zinc ont d'ailleurs souvent été impliqués dans le maintien conformationnel des protéines (McIntyre *et al.*, 1993). Bien que la protéine $\sigma 3$ N16K soit exprimée de façon stable chez des cellules COS transfectées, le groupe de K. M. Coombs suggère que la protéine $\sigma 3$, synthétisée lors de la multiplication du virus ts453 à température non-permissive (37°C), adopte une conformation contribuant à réduire sa stabilité et à empêcher son association avec $\mu 1$ (Shing and Coombs, 1996).

Des études récentes d'immunofluorescence démontrent la présence de la protéine $\sigma 3$ dans le noyau de cellules transfectées à l'aide d'un vecteur d'expression de $\sigma 3$ (Yue and Shatkin, 1996). Des résultats préliminaires obtenus dans notre laboratoire avaient également suggérés la présence de $\sigma 3$ dans le noyau de cellules L929 infectées avec réovirus (Mabrouk *et al.*, American Society for Virology Meeting, 1994). Bien que le rôle exact de la présence nucléaire de $\sigma 3$ soit inconnu, cette distribution intracellulaire semble associée à l'efficacité de la protéine à lier l'ARN bicaténaire; d'autres protéines capables de lier l'ARN bicaténaire, telles que la protéine p25 du

virus de la vaccine et la PKR, sont également partiellement localisées au noyau (Yuwen *et al.*, 1993; Jeffrey *et al.*, 1995).

À l'aide des techniques de fractionnement cellulaire et de coloration immunohistochimique utilisant la microscopie électronique, nous avons déterminé la proportion de molécules $\sigma 3$ retrouvée à l'intérieur des différents compartiments cellulaires. Nos résultats démontrent qu'une plus grande proportion de molécules $\sigma 3$ N16K est retrouvée dans le noyau de cellules transfectées, comparativement aux cellules transfectées avec le plasmide codant pour la protéine $\sigma 3$ de type sauvage. Suite à une co-expression des protéines $\sigma 3$ et $\mu 1$, on note également une plus grande quantité de molécules $\sigma 3$ de type sauvage au niveau du cytoplasme. Cependant, la présence de $\mu 1$ n'influence pas la distribution intracellulaire des molécules $\sigma 3$ N16K, ces dernières n'interagissant plus avec $\mu 1$.

Nos résultats confirment qu'il y a une corrélation entre la capacité de $\sigma 3$ à lier l'ARN bicaténaire et la localisation nucléaire de la protéine; la protéine $\sigma 3$ N16K démontrant une plus grande affinité pour l'ARN bicaténaire que la protéine $\sigma 3$ de type sauvage. Étant donné que la capacité de $\sigma 3$ à lier l'ARN bicaténaire est impliquée dans la régulation de la PKR, il est possible que la présence nucléaire de $\sigma 3$ soit associée au processus d'inactivation de la kinase. Cette hypothèse est soutenue par le fait que la coloration immunohistochimique des cellules L929 infectées par le réovirus révèle la présence de $\sigma 3$ aux environs des nucléoles, lieu de synthèse de l'ARN ribosomal. Il avait déjà été démontré que la protéine $\sigma 3$ issue de la fraction cytoplasmique était enrichie suite au traitement des ribosomes provenant de cellules infectées à l'aide

d'une forte concentration de sel (0.5M NaCl, 'Ribosomal Salt Wash') (Lemay and Millward, 1986a; Lemieux *et al.*, 1987). Ainsi, l'inhibition de la PKR par $\sigma 3$ pourrait se faire localement au niveau des ribosomes au moment de l'initiation de la synthèse protéique. Il serait donc intéressant de déterminer les protéines cellulaires pouvant interagir avec $\sigma 3$. Le système des doubles hybrides (GAL4) chez la levure pourrait constituer une bonne approche en permettant l'utilisation d'une librairie d'ADN complémentaire provenant de cellules L929 de souris.

Suite au traitement de cellules en culture avec l'interféron, celles-ci manifestent une augmentation du niveau d'expression de la PKR (Hovanessian, 1993; Katze, 1992; Katze, 1993; Samuel, 1991; Sonenberg, 1990). Tel que discuté dans la revue de la littérature, la présence d'ARN bicaténaire ou monocaténaire, riche en structures secondaires, active la PKR. Cette activation résulte en une inhibition de la synthèse protéique. La voie d'activation de la PKR constituerait le principal mécanisme induit par l'interféron pour contrecarrer la multiplication des réovirus (De Benedetti *et al.*, 1985; Gupta *et al.*, 1982; Miyamoto and Samuel, 1980; Nilsen *et al.*, 1982; Wiebe and Joklik, 1975). Malgré le fait que les réovirus aient adopté un mécanisme efficace pour minimiser l'effet antiviral induit par l'interféron, on remarque une diminution de la synthèse des protéines virales chez les cellules L929 préalablement traitées à l'interféron- β . La découverte que le virus ts453 est plus résistant à l'effet antiviral induit par l'interféron, et ce à température non-permissive, soutient l'idée que la résistance à l'interféron est dépendante de l'attachement de $\sigma 3$ à l'ARN bicaténaire. Le fait que les particules sous-virales infectieuses (ISVPs) dépourvues de $\sigma 3$ soient plus

sensible à l'effet de l'interféron indique l'importance des molécules $\sigma 3$ composant la capsid externe des virions dans la régulation du processus d'activation de la PKR; cette différence ne pouvant être attribuée à une réduction de l'efficacité de décapsidation du virus ts453, par rapport au virus de type sauvage (T3D).

Certaines observations suggèrent que la présence de $\mu 1$ empêche la protéine $\sigma 3$ de lier l'ARN bicaténaire et ainsi d'inhiber l'activation de la PKR. En effet, la forme complexée de $\sigma 3$ ($\sigma 3$ - $\mu 1/\mu 1C$) ne peut être isolée sur colonne d'ARN bicaténaire (Huismans and Joklik, 1976), et des expériences de co-transfection à l'aide de vecteurs d'expression codant à la fois pour $\sigma 3$ et $\mu 1$ démontrent que la présence de $\mu 1$ inhibe la capacité de $\sigma 3$ à stimuler la traduction de gènes rapporteurs (Tillotson and Shatkin, 1992). Dans ce système, la stimulation de la traduction est attribuable à une inhibition de la PKR grâce à l'affinité de la protéine $\sigma 3$ pour l'ARN bicaténaire. Bien que les expériences de fractionnement cellulaire effectuées sur des cellules COS co-transfectées démontrent que la présence de $\mu 1$ prévient la localisation nucléaire de $\sigma 3$, nos résultats ne nous permettent pas de conclure avec exactitude si une absence d'interaction de la protéine $\sigma 3$ avec $\mu 1$, ou une augmentation du degré d'affinité de la protéine $\sigma 3$ pour l'ARN bicaténaire, est responsable de la résistance à l'interféron observée pour le virus ts453. Toutefois, il semble qu'une augmentation du degré d'affinité pour l'ARN bicaténaire soit suffisante à la régulation de la PKR. En effet, nous avons constaté que la protéine $\sigma 3$ N16K était plus efficace à stimuler la traduction du gène rapporteur CAT (chloramphénicol acétyl-transférase) que la protéine $\sigma 3$ de type sauvage (résultats non publiés). Il reste à démontrer si la présence

de $\mu 1$ peut affecter la capacité de la protéine $\sigma 3$ N16K à promouvoir l'expression du gène CAT.

L'ensemble de ces résultats suggère que la protéine $\sigma 3$ interviendrait à une étape précoce du cycle de multiplication des réovirus afin de réduire l'effet antiviral induit par l'interféron. Bien qu'il semble y avoir un lien entre l'efficacité de la protéine à lier l'ARN bicaténaire, l'inactivation de la PKR et la localisation nucléaire de $\sigma 3$, une première inhibition de la kinase pourrait avoir lieu au niveau du cytoplasme des cellules infectées. Par analogie, il a été démontré que l'efficacité des protéines mutées au niveau du gène E3L à rétablir la synthèse des protéines virales dans des cellules infectées par un virus de la vaccine défectif pour E3L, était associée à la capacité de lier l'ARN bicaténaire, plutôt qu'à la localisation nucléaire de ces protéines mutantes (Chang *et al.*, 1995). Le fait que les ISVPs dérivés du virus ts453 soient sensibles à l'effet de l'interféron indique que les molécules $\sigma 3$, constituant la capsid externe des virions, jouent un rôle important dans la régulation de la PKR au niveau du cytoplasme. Prenant en considération que la protéine $\sigma 3$ dépourvue de son domaine amino-terminal lie plus efficacement l'ARN bicaténaire que la protéine pleine longueur, la digestion protéolytique de $\sigma 3$ subséquent à la pénétration des virions à l'intérieur de la cellule pourrait contribuer à l'inhibition de la PKR. Ainsi, en début d'infection, l'activité anti-PKR de $\sigma 3$ ne dépendrait pas de la synthèse de nouvelles molécules de $\sigma 3$. Par contre, ceci n'exclut pas la possibilité que la protéine puisse également jouer un rôle dans l'inactivation de la PKR plus tardivement au cours de l'infection.

Étant donné qu'une infection naturelle implique la conversion des réovirions en ISVPs dans le tractus intestinal de l'hôte (Bodkin *et al.*, 1989), le rôle antiviral de l'interféron pourrait être plus important lors d'infection par voie orale. Afin de confirmer la protection conférée par la protéine $\sigma 3$ contre l'effet de l'interféron, il serait intéressant de déterminer le potentiel antiviral des virions de type sauvage et ts453 inactivés à l'aide de rayons ultraviolets. L'utilisation de particules virales non-infectieuses ('top components'), générées suite à l'infection de cellules avec les virus de type sauvage et le ts453, pourrait également permettre de comparer les niveaux d'activité antivirale des différentes molécules $\sigma 3$; on sait que l'assemblage des virions ne nécessite pas la présence d'ARN génomique, ce qui permet l'obtention d'une certaine quantité de particules virales 'vides' lors de l'infection (Lai *et al.*, 1973).

Bien qu'il s'agisse d'un phénomène peu étudié, l'effet antiviral conféré par une protéine provenant de la capside ne serait pas exclusif à réovirus. Les sous-unités pentamériques formant le virion du mengovirus (*Cardiovirus*, Picornaviridae) ont également été impliquées dans la régulation du mécanisme antiviral induit par l'interféron (King and Simon, 1993). Ces sous-unités protégeraient l'ARN génomique contre l'attaque subséquente des nucléases du système 2'-5'-oligoadénylate synthétase.

Les systèmes d'expression employant des cellules procaryotes (système bactérien pET) et eucaryotes (cellules COS) ont permis de démontrer que la région localisée près du motif à doigt de zinc de $\sigma 3$ était impliquée lors d'interaction

protéines-protéines et qu'elle pouvait avoir un effet sur la régulation de la synthèse protéique en contrôlant le degré d'affinité de la protéine pour l'ARN bicaténaire. Cependant, ces systèmes présentent plusieurs inconvénients (voir précédemment). Afin de mieux établir le rôle de $\sigma 3$ dans la stimulation des ARNm tardifs, la régulation de la synthèse protéique et dans l'établissement d'infections persistantes, nous avons choisi d'exprimer la protéine $\sigma 3$ chez la levure *Pichia pastoris*, et dans des cellules de mammifères permettant de contrôler le niveau d'expression de $\sigma 3$. Bien que ces deux approches n'aient pas donné tous les résultats escomptés (voir chapitre 3), il est possible d'exprimer la protéine $\sigma 3$ tant dans la levure que dans des cellules SC1 de souris modifiées pour synthétiser la protéine à l'aide d'un promoteur pouvant réguler son expression.

Le système d'expression chez *Pichia pastoris* nous a permis de mettre au point une méthode de purification employant la chromatographie d'affinité aux ions de zinc (Eagle and Klessig, 1992; Porath *et al.*, 1975). Cette méthode peut s'appliquer à n'importe quelle métalloprotéine, indépendamment de son degré d'affinité pour le zinc. En modifiant les conditions d'élution, cette méthode nous a d'ailleurs permis de purifier avec succès une autre protéine de réovirus (Bisaillon *et al.*, 1997). Malgré le faible niveau d'expression de la protéine $\sigma 3$, ce système permet de produire une protéine soluble. Il serait donc intéressant d'établir les conditions permettant d'optimiser les niveaux d'expression de la protéine. Une des options s'offrant à nous est de faire croître la souche de levure exprimant $\sigma 3$ dans une grande quantité de milieux de culture à l'aide d'un fermenteur. Cependant, étant donné que les protéines

$\sigma 3$ mutées au niveau du doigt de zinc ne peuvent être purifiées par chromatographie d'affinité sur colonne de zinc, ces mutants devront être exprimés sous forme de protéines de fusion à l'aide de la MBP (Maltose Binding Protein), ou d'une séquence d'histidines, les conditions de purification étant bien établies pour ces types de protéines de fusion.

Les tentatives d'établissement de lignées cellulaires permettant de contrôler l'expression de la protéine $\sigma 3$, témoignent de la difficulté de fonctionnement d'un tel système. En effet, il fut impossible d'obtenir une expression de $\sigma 3$ dans des cellules L929 de souris, probablement en raison d'une mauvaise expression de la protéine transactivatrice. Ainsi, l'efficacité du système semble dépendre, en grande partie, du type cellulaire utilisé.

L'expression de $\sigma 3$ a tout de même été possible dans des cellules SC1 de souris. Bien qu'aucune différence, au niveau des effets biologiques de la protéine, n'ait pu être observée entre les cellules SC1-tTA/S4 induites et non-induites, l'existence d'une lignée pouvant exprimer $\sigma 3$ de façon régulée pourrait tout de même s'avérer très utile. Le fait qu'il a été impossible d'établir une infection persistante chez les cellules SC1-tTA/S4 nous indique que la protéine $\sigma 3$ produite chez ces cellules peut être fonctionnellement active. L'interférence exercée par la présence de la protéine $\sigma 3$ de type sauvage concorde avec les observations démontrant que les virus isolés d'infections persistantes possèdent un gène S4 muté (Ahmed and Fields, 1982; Ahmed and Graham, 1977). Il serait donc intéressant de vérifier si l'expression de $\sigma 3$ par les cellules SC1-tTA/S4 peut compléter le virus ts453, à température non-permissive

(37°C), pour l'assemblage de la capside externe du réovirion. Dernièrement, le groupe de E. G. Brown a réussi à démontrer que la protéine $\mu 2$ exprimée de façon constitutive dans des cellules L929 pouvait, à haute température, compléter le virus thermosensible tsH11.2 déficient au niveau du gène M1, codant pour la protéine $\mu 2$ de la capside interne (Brown and Zou, 1996). Cependant, contrairement à la protéine $\sigma 3$, la protéine $\mu 2$ est retrouvée en moins grande quantité chez le virion (12 molécules de $\mu 2$ /virion comparativement à 600 molécules de $\sigma 3$ /virion), et son gène est moins efficacement transcrit et traduit que le gène S4. D'un point de vue structural, la complémentation du virus ts453 par une protéine $\sigma 3$ de type sauvage pourrait être impossible, mais demeure une expérience à considérer.

Dans l'éventualité d'une complémentation fonctionnelle, la lignée SC1-tTA/S4 pourrait servir à produire des particules virales infectieuses suite à l'introduction de gènes S4 défectifs pour remplacer le gène S4 de type sauvage. Ceci constituerait un premier pas vers l'élaboration d'une stratégie visant à pratiquer la génétique inverse pour l'étude des Reoviridae. Nous avons déjà à notre disposition des vecteurs permettant de synthétiser *in vitro* des ARNm renfermant à leurs extrémités 5' et 3' les séquences consensus normalement retrouvée chez les ARNm de réovirus. Ces vecteurs correspondent à l'ARNm du gène S4 et à un ARNm chimérique du gène rapporteur CAT (chloramphénicol acétyl-transférase) flanqué des extrémités 5' et 3' non codantes du gène S4. Grâce à un protocole établi par Roner *et al.*, des molécules d'ARN de réovirus peuvent maintenant être introduites dans des cellules de mammifères par lipofection et devenir infectieuses suite à l'addition d'un virus auxiliaire (T2J) (Roner

et al., 1990). Récemment, des signaux favorisant le réassortiment de segments hétérologues parmi le génome de réovirus ont également été identifiés (Roner *et al.*, 1995), et ceux-ci pourraient éventuellement être utilisés pour favoriser l'incorporation de molécules d'ARN exogène, dont l'ARNm correspondant au gène S4-CAT-S4. Étant donné que les virus recombinants obtenus par cette approche seront défectifs pour le gène S4, la lignée SC1-tTA/S4 pourra permettre la croissance et la multiplication de ceux-ci. Un des avantages d'utiliser le gène S4 plutôt que les autres gènes de réovirus est sa grande efficacité de transcription et de traduction lors du cycle de multiplication viral.

La pratique de la génétique inverse pourrait ainsi contribuer au développement d'une stratégie visant à utiliser le réovirus à titre de vecteur de gènes. Étant donné leur efficacité de multiplication chez une grande variété d'hôtes et leur faible pouvoir pathogène, les réovirus pourraient compter parmi les meilleurs vecteurs viraux pour le transfert de gènes étrangers.

Chapitre 5
Bibliographie

Acs, G., Klett, H., Schonberg, M., Christman, J., Levin, D. H., and Silverstein, J. C. (1971). Mechanism of reovirus double-stranded RNA synthesis *in vivo* and *in vitro*. *J. Virol.* **8**, 684-689.

Ahmed, R., Canning, W. M., Kauffman, R. S., Sharpe, A. H., Hallum, J. V., and Fields, B. N. (1981a). Role of the host cell in persistent viral infection: coevolution of L cells and reovirus during persistent infection. *Cell* **25**, 325-332.

Ahmed, R., Canning, W. M., Kauffman, R. S., Sharpe, A. H., Hallum, J. V., and Fields, B. N. (1981b). Role of the host cell in persistent viral infection: coevolution of L cells and reovirus during persistent infection. *Cell* **25**, 325-332.

Ahmed, R., Chakraborty, P. R., and Fields, B. N. (1980a). Genetic variation during lytic reovirus infection: high-passage stocks of wild-type reovirus contain temperature-sensitive mutants. *J Virol* **34**, 285-287.

Ahmed, R., Chakraborty, P. R., Graham, A. F., Ramig, R. F., and Fields, B. N. (1980b). Genetic variation during persistent reovirus infection: presence of extragenically suppressed temperature-sensitive lesions in wild-type virus isolated from persistently infected L cells. *J Virol* **34**, 383-389.

Ahmed, R., and Fields, B. N. (1982). Role of the S4 gene in the establishment of persistent reovirus infection in L cells. *Cell* **28**, 605-612.

Ahmed, R., and Graham, A. F. (1977). Persistent infections in L cells with temperature-sensitive mutants of reovirus. *J. Virol.* **23**, 250-262.

Amerongen, H. M., Wilson, G. A., Fields, B. N., and Neutra, M. R. (1994). Proteolytic processing of reovirus is required for adherence to intestinal M cells. *J. Virol* **68**, 8428-8432.

Anderson, N., and Doane, F. W. (1966). An electron-microscope study of reovirus type 2 in L cells. *J. Path. Bact.* **92**, 433-438.

Antczak, J. B., Chmelo, R., Pickup, D. J., and Joklik, W. K. (1982). Sequences at both termini of the ten genes of reovirus serotype 3 (strain Dearing). *Virology* **121**, 307-319.

Astell, C., Silverstein, S. C., Levin, D. H., and Acs, G. (1972). Regulation of the reovirus RNA transcriptase by a viral capsomere protein. *Virology* **48**, 648-654.

Atwater, J. A., Munemitsu, S. M., and Samuel, C. E. (1986). Biosynthesis of reovirus-specified polypeptides. Molecular cDNA cloning and nucleotide sequence of the reovirus serotype 1 Lang strain s4 mRNA which encodes the major capsid surface polypeptide sigma 3. *Biochem Biophys Res Commun* **136**, 183-192.

Aukland-Berglund, C. E., and Leib, D. A. (1995). Efficacy of tetracycline-controlled gene expression is influenced by cell type. *BioTechniques* **18**, 196-200.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1992a). Transfection of DNA into eukaryotic cells. Second Edition ed. *In* "Short protocols in molecular biology" (F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl, Eds.), pp. 9-3, 9-4. Greene Publishing Associates and John Wiley and Sons, New York.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1992b). Transformation by electroporation. Second Edition ed. *In* "Short protocols in molecular biology" (F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl, Eds.), pp. 13-30, 13-31, 13-32. Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, New York.

Baglioni, C., Minks, M. A., and Maroney, P. A. (1978). Interferon action may be mediated by activation of nuclease by pppA2'p5'A2'p5A. *Nature* **279**, 684-687.

Barber, G. N., Jagus, R., Meurs, E. F., Hovanessian, A. G., and Katze, M. G. (1995a). Molecular mechanisms responsible for malignant transformation by regulatory and catalytic domain variants of the interferon-induced enzyme RNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **270**, 17423-17428.

Barber, G. N., S., T., Lee, T. G., Strom, T., Jagus, R., Darveau, A., and Katze, M. G. (1994). The 58-kilodalton inhibitor of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase is a tetratricopeptide repeat protein with oncogenic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 4278-4282.

Barber, G. N., Wambach, M., Thompson, S., Jagus, R., and Katze, M. G. (1995b). *Mol. Cell. Biol.* **15**, 3138-3146.

Bazan, J. F., and Fletterick, R. J. (1988). Viral cysteine proteases: structural and functional implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 7872-7876.

Beattie, E., Denzler, K. L., Tartaglia, J., Perkus, M. E., Paoletti, E., and Jacobs, B. L. (1995a). Reversal of the interferon-sensitive phenotype of a vaccinia virus lacking E3L by expression of the reovirus S4 gene. *J Virol* **69**, 499-505.

Beattie, E., Paoletti, E., and Tartaglia, J. (1995b). Distinct patterns of IFN sensitivity observed in cells infected with vaccinia K3L- and E3L- mutant viruses. *Virology* **210**, 254-263.

Beattie, E., Tartaglia, J., and Paoletti, E. (1991). Vaccinia virus-encoded eIF-2 α homolog abrogates the antiviral effect of interferon. *Virology* **183**, 419-422.

- Bell, T. M., and Ross, M. G. R.** (1966). Persistent latent infection of human embryonic cells with reovirus type 3. *Nature* **212**, 412-414.
- Bellamy, A. R., and Hole, L. V.** (1970). Single-stranded oligonucleotides from reovirus type 3. *Virology* **40**, 808-819.
- Bellamy, A. R., and Joklik, W. K.** (1967). Studies on the A-rich RNA of reovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **58**, 1389-1395.
- Bellamy, A. R., Nichols, J. L., and Joklik, W. K.** (1972). Nucleotide sequences of reovirus oligonucleotides: evidence for abortive RNA synthesis during virus maturation. *Nature New Biol.* **238**, 49-51.
- Berry, M. J., Knutson, G. S., Laskey, S. R., Munemitsu, S. M., and Samuel, C. E.** (1985). Mechanism of action of interferon. Purification and substrate specificities of the double-stranded RNA-dependent protein kinase from untreated and interferon-treated mouse fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **260**, 11240-11247.
- Bhat, R. A., and Thimmappaya, B.** (1983). Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus can functionally substitute for the virus-associated RNAs in lytic growth of adenovirus 5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 4789-4793.
- Bisaillon, M., Bergeron, J., and Lemay, G.** (1997) Characterization of the NTPase and helicase activities of reovirus $\lambda 1$ protein. *J. Biol. Chem.* **272**, 18298-18303.
- Bodkin, D. K., and Fields, B. N.** (1989). Growth and survival of reovirus in intestinal tissue: role of the L2 and S1 genes. *J Virol* **63**, 1188-1193.
- Bodkin, D. K., Nibert, M. L., and Fields, B. N.** (1989). Proteolytic digestion of reovirus in the intestinal lumens of neonatal mice. *J Virol* **63**, 4676-4681.
- Borman, A. M., Kirchweger, R., Ziegler, E., Rhoads, R. E., Skern, T., and Kean, K. M.** (1997). eIF4G and its proteolytic cleavage products: effect on initiation of protein synthesis from capped, uncapped, and IRES-containing mRNAs. *RNA* **3**, 186-196.
- Borsa, J., Sargent, M. D., Lievaart, P. A., and Copps, T. P.** (1979). Two modes of entry of reovirus particles into L cells. *J. Gen. Virol.* **45**, 161-170.
- Borsa, J., Sargent, M. D., Long, D. G., and Chapman, J. D.** (1973). Extraordinary effects of specific monovalent cations on activation of reovirus transcriptase by chymotrypsin *in vitro*. *J. Virol.* **11**, 207-217.

- Both, G. W., Bellamy, A. R., and Siegman, L. J.** (1984). Nucleotide sequence of the dsRNA genomic segment 7 of Simian 11 rotavirus. *Nucleic Acids Res.* **12**, 1621-1626.
- Brown, E. G., and Zou, S.** (1996). Stable expression of the reovirus $\mu 2$ protein in mouse L cells complements the growth of a reovirus ts mutant with defect in its M1 gene. *Virology* **217**, 42-48.
- Callahan, P. L., Muzutani, S., and Colonno, R. J.** (1985). Molecular cloning and complete nucleotide sequence determination of RNA genome of human rhinovirus type 14. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 732-736.
- Canning, W. M., and Fields, B. N.** (1983). Ammonium chloride prevents lytic growth of reovirus and helps to establish persistent infection in mouse L cells. *Science* **219**, 987-988.
- Carroll, K., Elroy-Stein, O., Moss, B., and Jagus, R.** (1993). Recombinant vaccinia virus K3L gene product prevents activation of double-stranded RNA-dependent, initiation factor 2 α -specific protein kinase. *J. Biol. Chem.* **268**, 12837-12842.
- Chaly, N., Johnstone, M., and Hand, R.** (1979). Alteration in nuclear structure and function in reovirus-infected cells. *Clin. Invest. Med.* **2**, 141-152.
- Chang, C. T., and Zweerink, H. J.** (1971). Fate of parental reovirus in infected cells. *Virology* **47**, 544-555.
- Chang, H. W., and Jacobs, B. L.** (1993). Identification of conserved motif that is necessary for binding of the vaccinia virus E3L gene products to double-stranded RNA. *Virology* **194**, 537-547.
- Chang, H.-W., Uribe, L. H., and Jacobs, B. L.** (1995). Rescue of vaccinia virus lacking the E3L gene by mutant of E3L. *J. Virol.* **69**, 6605-6608.
- Chebath, J., Benech, P., Revel, M., and Vigneron, M.** (1987). Constitutive expression of (2'-5') oligoA synthetase confers resistance to picornavirus infection. *Nature* **330**, 587-590.
- Chong, K. L., Feng, L., Schappert, K., Meurs, E., Donahue, T. F., Friesen, J. D., Hovanessian, A. G., and Williams, B. R. G.** (1992). Human p68 kinase exhibits growth suppression in yeast and homology to the translational regulator GCN2. *EMBO J.* **11**, 1553-1562.
- Clare, J. J., Rayment, F. B., Ballantine, S. B., Sreekrishna, K., and Romanos, M. A.** (1991). High-level expression of tetanus toxine fragment C in *Pichia pastoris*

strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Bio/Technology* **9**, 455-457.

Clarke, P. A., Schwemmle, M., Schickinger, J., Hilse, K., and Clemens, M. J. (1991). Binding of Epstein-Barr virus small RNA EBER-1 to the double-stranded RNA-activated protein kinase DAI. *Nucleic Acids Res.* **19**, 243-248.

Clemens, M. J. (1994). Regulation of eukaryotic protein synthesis by protein kinases that phosphorylate initiation factor eIF-2. *Mol. Biol. Rep.* **19**, 201-210.

Clemens, M. J., Laing, K. G., Jeffrey, I. W., Schofield, A., Sharp, T. V., Elia, A., Matys, V., James, M. C., and Tilleray, V. J. (1994). Regulation of the interferon-inducible eIF-2 alpha protein kinase by small RNAs. *Biochimie* **76**, 770-778.

Clemens, M. J., and Williams, B. R. G. (1978). Inhibition of protein synthesis by pppA2'p5'A2p5A: a novel oligonucleotide synthesized by interferon-treated L cell extracts. *Cell* **13**, 565-572.

Cleveland, D. R., Zarbl, H., and Millward, S. (1986). Reovirus guanylyltransferase is L2 gene product lambda 2. *J Virol* **60**, 307-311.

Crane, D. I., and Gould, S. J. (1994). The *Pichia pastoris* HIS4 gene: nucleotide sequence, creation of a non-reverting his4 deletion mutant, and development of HIS4-based replicating and integrating plasmids. *Curr. Genet.* **26**, 443-450.

Cregg, J. M., Tschopp, J. F., Stillman, C., Siegel, R., Akong, M., Craig, W. S., Buckholz, R. G., Madden, K. R., Kellaris, P. A., Davis, G. R., Smiley, B. L., Cruze, J., Torregrossa, R., Velicelebi, G., and Thill, G. P. (1987). High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* **5**, 479-485.

Dale, C., Iman, A. M. A., Kerr, I. M., and Stark, G. R. (1989). Rapid activation by interferon- α of a latent DNA-binding protein present in the cytoplasm of untreated cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1203-1207.

Dales, S. (1963). Association between the spindle apparatus and reovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **50**, 268-275.

Dales, S., and Gomatos, P. J. (1965). The uptake and development of reovirus in strain L cells followed with labeled viral ribonucleic acid and ferritin-antibody conjugates. *Virology* **25**, 193-211.

Danis, C., Garzon, S., and Lemay, G. (1992). Further characterization of the ts453 mutant of mammalian orthoreovirus serotype 3 and nucleotide sequence of the mutated S4 gene. *Virology* **190**, 494-498.

Danis, C., Mabrouk, T., Garzon, S., and Lemay, G. (1993a). Establishment of persistent reovirus infection in SC1 cells: absence of protein synthesis inhibition and increased level of double-stranded RNA-activated protein kinase. *Virus Res.* **27**, 253-265.

Danis, C., Mabrouk, T., and Lemay, G. (submitted-a). PKR induction by interferon has no protective effect during acute or persistent reovirus infection of mouse SC1 fibroblasts.

Danis, C., Wetzel, J. D., Dermody, T. S., and Lemay, G. (submitted-b). Resistance to reovirus in parental and persistently infected SC1 cells involves an early step in the viral multiplication cycle.

Davies, M. V., Elroy-Stein, O., Jagus, R., Moss, B., and Kaufman, R. I. (1992). The vaccinia virus K3L gene product potentiates translation by inhibiting double-stranded RNA-activated protein kinase and phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2. *J. Virol.* **66**, 1943-1950.

De Benedetti, A., Williams, G. J., and Baglioni, C. (1985). Inhibition of binding to initiation complexes of nascent reovirus mRNA by double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J Virol* **54**, 408-413.

Denzler, K. L., and Jacobs, B. L. (1994). Site-directed mutagenic analysis of reovirus sigma 3 protein binding to dsRNA. *Virology* **204**, 190-199.

Dermody, T. S., Chappell, J. D., Hofler, J. G., Kramp, W., and Tyler, K. L. (1995). Eradication of persistent reovirus infection from a B-cell hybridoma. *Virology* **212**, 272-276.

Dermody, T. S., Nibert, M. L., Wetzel, J. D., Tong, X., and Fields, B. N. (1993). Cells and viruses with mutations affecting viral entry are selected during persistent infections of L cells with mammalian reoviruses. *J. Virol.* **67**, 2055-2063.

Detjen, B. M., Walden, W. E., and Thach, R. E. (1982). Translational specificity in reovirus-infected mouse fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **257**, 9855-9860.

Domann, R., and Martinez, J. (1995). Alternative to cloning cylinders for isolation of adherent cell clones. *BioTechniques* **18**(4).

Dryden, K. A., Wang, G., Yeager, M., Nibert, M. L., Coombs, K. M., Furlong, D. B., Fields, B. N., and Baker, T. S. (1993). Early steps in reovirus infection are associated with dramatic changes in supramolecular structure and protein conformation: analysis of virions and subviral particles by cryoelectron microscopy and image reconstruction. *J. Cell. Biol.* **122**, 1023-1041.

Duncan, R., Frederick, M. A., and Radmilla, M. R. (1995). Characterization of a novel syncytium-inducing baboon reovirus. *Virology* **212**, 752-756.

Duncan, R., Horne, D., Strong, J. E., Leone, G., Pon, R. T., Yeung, M. C., and Lee, P. W. (1991). Conformational and functional analysis of the C-terminal globular head of the reovirus cell attachment protein. *Virology* **182**, 810-819.

Duncan, R. C., Chen, Z., Walsh, S., and Wu, S. (1996). Avian reovirus-induced syncytium formation is independent of infectious progeny virus production and enhances the rate, but is not essential, for virus-induced cytopathology and virus egress. *Virology* **224**, 453-464.

Eagle, P. A., and Klessig, D. F. (1992). A zinc-binding motif located between amino acids 273 and 286 in the adenovirus DNA-binding protein is necessary for ssDNA binding. *Virology* **187**, 777-787.

Ensminger, W. D., and Tamm, I. (1969). Cellular DNA and protein synthesis in reovirus-infected cells. *Virology* **39**, 357-359.

Ensminger, W. D., and Tamm, I. (1970). Inhibition of synchronized cellular deoxyribonucleic acid synthesis during newcastle disease virus, mengovirus, or reovirus infection. *J. Virol.* **5**, 672-676.

Ernst, H., and Shatkin, A. J. (1985). Reovirus hemagglutinin mRNA codes for two polypeptides in overlapping reading frames. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 48-52.

Faber, K. N., Harder, W., Ab, G., and Veenhuis, M. (1995). Review: methylotrophic yeast as factories for the production of foreign proteins. *Yeast* **11**, 1331-1344.

Fernandes, J., Tang, D., Leone, G., and Lee, P. W. (1994). Binding of reovirus to receptor leads to conformational changes in viral capsid proteins that are reversible upon virus detachment. *J Biol Chem* **269**, 17043-17047.

Fields, B. N. (1994). Reoviruses: general features. In "Encyclopedia of virology" (R. G. Webster, and A. Granoff, Eds.), Vol. Third volume, pp. 1190-1194. Bath Press, Great Britain.

Fields, B. N., Raine, C. S., and Baum, S. G. (1971). Temperature-sensitive mutants of reovirus 3: defects in viral maturation as studied by immunofluorescence and electron microscopy. *Virology* **43**, 569-578.

- Finberg, R., Weiner, H. L., Fields, B. N., Benacerraf, B., and Burakoff, S. J.** (1979). Generation of cytolytic T lymphocytes after reovirus infection: role of S1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 442-446.
- Fraser, R. D., Furlong, D. B., Trus, B. L., Nibert, M. L., Fields, B. N., and Steven, A. C.** (1990). Molecular structure of the cell-attachment protein of reovirus: correlation of computer-processed electron micrographs with sequence-based predictions. *J Virol* **64**, 2990-3000.
- Freeman, R., and Estus, S. E. M.** (1994). Analysis of cell-cycle related gene expression in postmitotic neurons: selective induction of cyclin D1 during programmed cell death. *Neuron* **12**, 343-355.
- Fu, X.-Y., Kessler, D. S., Veals, S. A., Levy, D. E., and Darnell, J. E.** (1990). ISGF3, the transcriptional activator induced by interferon- α , consists of multiple interacting polypeptide chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8555-8559.
- Furlong, D. B., Nibert, M. L., and Fields, B. N.** (1988). Sigma 1 protein of mammalian reoviruses extends from the surfaces of viral particles. *J Virol* **62**, 246-256.
- Furuichi, Y., and Shatkin, A. J.** (1977). A simple method for the preparation of β -³²P purine nucleoside triphosphates. *Nucleic Acids Res.* **4**, 3341-3354.
- Galabru, J., and Hovanessian, A. G.** (1987). Autophosphorylation of the protein kinase dependent on double-stranded RNA. *J. Biol. Chem.* **262**, 15538-15544.
- Galabru, J., Katze, M. G., Robert, N., and Hovanessian, A. G.** (1989). The binding of double-stranded RNA and adenovirus VAI RNA to the interferon-induced protein kinase. *Eur J Biochem* **178**, 581-589.
- Gale, M. J., Tan, S. L., Wambach, M., and Katze, M. G.** (1996). Interaction of the interferon-induced PKR protein kinase with inhibitory proteins p58IPK and vaccinia virus K3L is mediated by unique domains: implication for kinase regulation. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4172-4181.
- Garcia-Martinez, C., Guinea, R., Benavente, J., and Carrasco, L.** (1996). The entry of reovirus into L cells is dependent on vacuolar proton-ATPase activity. *J. Virol.* **70**, 576-579.
- Gard, G., and Compans, R. W.** (1970). Structure and cytopathic effects of Nelson Bay Virus. *J. Virol.* **6**, 100-106.

- Gaulton, G. N., and Greene, M. I.** (1989). Inhibition of cellular DNA synthesis by reovirus occurs through a receptor-linked signaling pathway that is mimicked by anti-idiotypic anti-receptor antibody. *J. Exp. Med.* **169**, 197-211.
- Gelberg, H. B., Hall, W. F., Woode, G. N., Basgall, E. J., and Scherba, G.** (1990). Multinucleate enterocytes associated with experimental group A porcine rotavirus infection. *Vet. Pathol.* **27**, 453-454.
- George, C. X., Thomis, D. C., McCormack, S. J., Svahn, C. M., and Samuel, C. E.** (1996). Characterization of the heparin-mediated activation of PKR, the interferon-inducible RNA-dependent protein kinase. *Virology* **221**, 180-188.
- Giantini, M., Seliger, L. S., Furuichi, Y., and Shatkin, A. J.** (1984). Reovirus type 3 genome segment S4: Nucleotide sequence of the gene encoding a major virion surface protein. *J. Virol.* **52**, 984-987.
- Giantini, M., and Shatkin, A. J.** (1987). Reovirus major capsid protein expressed in *Escherichia coli*. *Gene* **56**, 153-160.
- Giantini, M., and Shatkin, A. J.** (1989). Stimulation of chloramphenicol acetyltransferase mRNA translation by reovirus capsid polypeptide sigma 3 in cotransfected COS cells. *J. Virol.* **63**, 2415-2421.
- Gilmore, R., Coffey, M. C., Leone, G., and Lee, P. W.** (1996). Co-translational trimerization of the reovirus cell attachment protein. *EMBO Journal* **15**, 2651-2658.
- Gomatos, P. J., and Stoeckenius, W.** (1964). Electron microscope studies on reovirus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **52**, 1449-1455.
- Gomatos, P. J., and Tamm, I.** (1963a). Animal and plant viruses with double-helical RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **50**, 878-885.
- Gomatos, P. J., and Tamm, I.** (1963b). Macromolecular synthesis in reovirus-infected L cells. *Biochim. Biophys. Acta* **72**, 651-653.
- Gomatos, P. J., Tamm, I., Dales, S., and Franklin, R. M.** (1962). Reovirus type 3: physical characteristics and interactions with L cells. *Virology* **17**, 441-454.
- Gombold, J. L., and Ramig, R. F.** (1989). Passive immunity modulates genetic reassortment between rotaviruses in mixedly infected mice. *J. Virol.* **63**, 4525-4532.
- Gossen, M., Bonin, A., and Bujard, H.** (1993). Control of gene activity in higher eukaryotic cells by prokaryotic regulatory elements. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 471-475.

Gossen, M., and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5547-5551.

Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Müller, G., Hillen, W., and Bujard, H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* **268**, 1766-1769.

Green, S. R., and Mathews, M. B. (1992). Two RNA-binding motifs in the double-stranded RNA-activated protein Kinase, DAI. *Genes Dev.* **6**, 2478-2490.

Gupta, S. L., Holmes, S. L., and Mehra, L. L. (1982). Interferon action against reovirus: activation of interferon-induced protein kinase in mouse L929 cells upon reovirus infection. *Virology* **120**, 495-499.

Haller, B. L., Barkon, M. L., Li, X. Y., Hu, W. M., Wetzel, J. D., Dermody, T. S., and Virgin, H. W. T. (1995a). Brain- and intestine-specific variants of reovirus serotype 3 strain Dearing are selected during chronic infection of severe combined immunodeficient mice. *J Virol* **69**, 3933-3937.

Haller, B. L., Barkon, M. L., Vogler, G. P., and Virgin, H. W. T. (1995b). Genetic mapping of reovirus virulence and organ tropism in severe combined immunodeficient mice: organ-specific virulence genes. *J Virol* **69**, 357-364.

Hanas, J. S., Hazuda, D. J., Bogenhagen, D. F., Wu, F. J.-Y., and Wu, C.-W. (1983). Xenopus transcription factor A requires zinc for binding to the 5S RNA gene. *J. Biol. Chem.* **258**, 1420-1425.

Hastings, K. E. M., and Millward, S. (1978). Nucleotide sequences at the 5'-termini of reovirus mRNAs. *J. Virol.* **28**, 490-498.

Hastings, K. E. M., and Millward, S. (1981). Similar sets of terminal oligonucleotides from reovirus double-stranded RNA and viral messenger RNA synthesized in vitro. *Can. J. Biochem.* **59**, 151-157.

Hayes, E. C., Lee, P. W. K., Miller, S. E., and Joklik, W. K. (1981). The interaction of a series of hybridoma IgGs with reovirus particles. Demonstration that the core protein lambda 2 is exposed on the particle surface. *Virology* **108**, 147-155.

Henry, G. L., McCormack, S. J., Thomis, D. C., and Samuel, C. E. (1994). Mechanism of interferon action. Translational control and the RNA-dependent protein kinase (PKR): antagonists of PKR enhance the translational activity of mRNAs that include a 161 nucleotide region from reovirus S1 mRNA. *J Biol Regul Homeost Agents* **8**, 15-24.

- Hentze, M. W.** (1997). eIF4G: a multipurpose ribosome adaptor? *Science* **275**, 500-501.
- Hoffman, L. M., Hogan, K. T., and Cashdollar, L. W.** (1996). The reovirus nonstructural protein σ 1NS is recognized by murine cytotoxic T lymphocytes. *J. Virol.* **70**, 8160-8164.
- Hovanessian, A. G.** (1993). Interferon-induced dsRNA-activated protein kinase: antiproliferative, antiviral and antitumoral functions. *Semin. Virol.* **4**, 237-246.
- Hovanessian, A. G., and Galabru, J.** (1987). The double-stranded RNA-dependent protein kinase is also activated by heparin. *Eur. J. Biochem.* **167**, 467-473.
- Huisman, H., and Joklik, W. K.** (1976). Reovirus coded polypeptides in infected cells: isolation of two native monomeric polypeptides with affinity for single-stranded and double-stranded RNA respectively. *Virology* **70**, 411-424.
- Iizuka, N., Kuge, S., and Nomoto, A.** (1987). Complete nucleotide sequence of the genome of coxsackievirus B1. *Virology* **156**, 64-73.
- Imani, F., and Jacobs, B. L.** (1988). Inhibitory activity for the interferon-induced protein kinase is associated with the reovirus serotype 1 sigma 3 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 7887-7891.
- Isaacs, A., and Lindenmann, J.** (1957). Virus interference: I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond.* **147**, 258-263.
- Ito, Y., and Joklik, W. K.** (1972). Temperature sensitive mutants of reovirus. I. Patterns of gene expression by mutants of groups C, D and E. *Virology* **50**, 189-201.
- Jacobs, B. L., and Imani, F.** (1988). Histone protein inhibit activation of the interferon-induced protein kinase by binding to double-stranded RNA. *J. Interferon Res.* **8**, 821-830.
- Jacobs, B. L., and Samuel, C. E.** (1985). Biosynthesis of reovirus-specified polypeptides: the reovirus s1 mRNA encodes two primary translation products. *Virology* **143**, 63-74.
- Joklik, W. K.** (1972). Studies on the effect of chymotrypsin on reovirions. *Virology* **49**, 700-801.
- Katze, M. G.** (1992). The war against the interferon-induced dsRNA-activated protein kinase: can viruses win? *J. Interferon Res.* **12**, 241-248.

- Katze, M. G.** (1993). Games viruses play: a strategic initiative against the interferon-induced dsRNA-activated 68,000Mr protein kinase. *Semin. Virol.* **4**, 259-268.
- Kauffman, R. S., Ahmed, R., and Fields, B. N.** (1983a). Selection of a mutant S1 gene during reovirus persistent infection of L cells: role in maintenance of the persistent state. *Virology* **131**, 79-87.
- Kauffman, R. S., Wolf, J. L., Finberg, R., Trier, J. S., and Fields, B. N.** (1983b). The sigma 1 protein determines the extent of spread of reovirus from the gastrointestinal tract of mice. *Virology* **124**, 403-410.
- Kaufman, R. J., and Murtha, P.** (1987). Translational control mediated by eukaryotic initiation factor-2 is restricted to specific mRNAs in transfected cells. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 1568-1571.
- Kaye, K. M., Spriggs, D. R., Bassel-Duby, R., Fields, B. N., and Tyler, K. L.** (1986). Genetic basis for altered pathogenesis of an immune-selected antigenic variant of reovirus type 3 (Dearing). *J Virol* **59**, 90-97.
- Kedl, R., Schmechel, S., and Schiff, L.** (1995). Comparative sequence analysis of the reovirus S4 genes from 13 serotype 1 and serotype 3 field isolates. *J Virol* **69**(1), 552-559.
- Keroack, M., and Fields, B. N.** (1986). Viral shedding and transmission between hosts determined by reovirus L2 gene. *Science* **232**, 1635-1638.
- King, R. W., and Simon, E. H.** (1993). The virion of mengovirus contains anti-interferon activity. *J. Interferon Res.* **13**, 1-7.
- Kitajewski, J., Schneider, R. J., Safer, B., Munemitsu, S. M., Samuel, C. E., Thimmappaya, B., and Shenk, T.** (1986). Adenovirus VA I RNA antagonizes the antiviral action of interferon by preventing activation of the interferon-induced eIF-2 kinase. *Cell* **45**, 195-200.
- Koromilas, A. E., Roy, S., Barber, G. N., Katze, M. G., and Sonenberg, N.** (1992). Malignant transformation by mutant of the INF-inducible dsRNA-dependent protein kinase. *Science* **257**, 1685-1689.
- Kostura, M., and Mathews, M. B.** (1989). Purification and activation of the double-stranded RNA-dependent eIF-2 kinase DAI. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 1576-1586.
- Kozak, M.** (1986). Regulation of protein synthesis in virus-infected animal cells. *Adv. Virus. Res.* **31**, 229-292.

- Krug, R. M., Shaw, M., Broni, V., Shapiro, G., and Haller, O.** (1985). Inhibition of influenza viral mRNA synthesis in cells expressing the interferon-induced Mx gene product. *J. Virol.* **56**, 201-206.
- Krust, B., Galabru, J., and Hovanessian, A. G.** (1984). Further characterization of the protein kinase activity mediated by interferon in mouse and human cells. *J. Biol. Chem.* **259**, 8494-8498.
- Kudo, H., and Graham, A. F.** (1966). Selective inhibition of reovirus induced RNA in L cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **24**, 150-155.
- Kumar, A., Haque, J., Lacoste, J., Hiscott, J., and Williams, B. R.** (1994). Double-stranded RNA-dependent protein kinase activates transcription factor NF-kappa B by phosphorylating I-kappa B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 6288-6292.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lai, M.-H. T., Werenne, J. J., and Joklik, W. K.** (1973). The preparation of reovirus top component and its effect on host DNA and protein synthesis. *Virology* **54**, 237-244.
- Lasky, S. R., Jacobs, B. L., and Samuel, C. E.** (1982). Mechanism of interferon action: characterization of sites of phosphorylation in the interferon-induced phosphoprotein P1 from mouse fibroblasts: evidence for two forms of P1. *J. Biol. Chem.* **257**, 11087-11093.
- Lee, P. W. K., Hayes, E. C., and Joklik, W. K.** (1981a). Protein sigma 1 is the reovirus cell attachment protein. *Virology* **108**, 156-163.
- Lee, P. W. K., Hayes, E. C., and Joklik, W. K.** (1981b). Characterization of anti-reovirus immunoglobulins secreted by cloned hybridoma cell lines. *Virology* **108**, 134-146.
- Lee, P. W. K., Hayes, E. C., and Joklik, W. K.** (1981c). Protein σ 1 is the reovirus cell attachment protein. *Virology* **108**, 134-146.
- Lee, T. G., Tang, N., Thompson, S., Miller, J., and Katze, M. G.** (1994). The 58,000-dalton cellular inhibitor of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) is a member of the tetratricopeptide repeat family of proteins. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 2331-2342.
- Lee, T. G., Tomita, J., Hovanessian, A. G., and Katze, M. G.** (1990). Purification and partial characterization of a cellular inhibitor of the interferon-induced protein

kinase of Mr 68,000 from influenza virus-infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6208-6212.

Lemay, G., and Danis, C. (1993). Protein synthesis in different cell lines infected with orthoreovirus serotype 3: inhibition of host-cell protein synthesis correlates accelerated viral multiplication and cell killing. *Biochem. Cell Biol.* **71**, 81-85.

Lemay, G., and Millward, S. (1986a-b). Expression of the cloned S4 gene of reovirus serotype 3 in transformed eucaryotic cells: enrichment of the viral protein in the crude initiation factor fraction. *Virus Res* **6**, 133-140.

Lemay, G., and Millward, S. (1986c). Inhibition of translation in L-cell lysates by free polyadenylic acid: differences in sensitivity among different mRNAs and possible involvement of an initiation factor. *Arch Biochem Biophys* **249**, 191-198.

Lemieux, R., Lemay, G., and Millward, S. (1987). The viral protein sigma 3 participates in translation of late viral mRNA in reovirus-infected L cells. *J. Virol.* **61**, 2472-2479.

Lemieux, R., Zarbl, H., and Millward, S. (1984). mRNA discrimination in extracts from uninfected and reovirus-infected L-cells. *J. Virol.* **51**, 215-222.

Leone, G., Duncan, R., and Lee, P. W. (1991). Trimerization of the reovirus cell attachment protein (sigma 1) induces conformational changes in sigma 1 necessary for its cell-binding function. *Virology* **184**, 758-761.

Levin, D., and London, I. M. (1978). Regulation of protein synthesis: activation by double-stranded RNA of a protein kinase that phosphorylates eukaryotic initiation factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 1121-1125.

Lewin, B. (1988). La chaîne de montage de la synthèse protéique. In 'Genes III' (B. In Lewin, Ed), pp. 97-121. Flammarion Medecine-Sciences, Paris.

Lewin, B. (1990). The assembly line for protein synthesis. In "Gene IV" (B. In Lewin, Ed.), pp. 126-135. Oxford university press, New York.

Lloyd, R. M., and Shatkin, A. J. (1992). Translational stimulation by reovirus polypeptide sigma 3: substitution for VAI RNA and inhibition of phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2. *J Virol* **66**, 6878-6884.

Lucia-Jandris, P., Hooper, J. W., and Fields, B. N. (1993). Reovirus M2 gene is associated with chromium release from mouse L cells. *J Virol* **67**, 5339-5345.

- Mabrouk, T., Danis, C., and Lemay, G. (1995).** Two basic motifs of reovirus $\sigma 3$ protein are involved in double-stranded RNA binding. *Biochem. Cell Biol.* **73**, 137-145.
- Mabrouk, T., and Lemay, G. (1994a).** Mutations in a CCHC zinc-binding motif of the reovirus sigma 3 protein decrease its intracellular stability. *J Virol* **68**, 5287-5290.
- Mabrouk, T., and Lemay, G. (1994b).** The sequence similarity of reovirus sigma 3 protein to picornaviral proteases is unrelated to its role in mu 1 viral protein cleavage. *Virology* **202**, 615-620.
- Mao, Z. X., and Joklik, W. K. (1991).** Isolation and enzymatic characterization of protein lambda 2, the reovirus guanylyltransferase. *Virology* **185**, 377-386.
- Martin, P. E., and McCrae, M. A. (1993).** Analysis of the stimulation of reporter gene expression by the sigma 3 protein of reovirus in co-transfected cells. *J Gen Virol* **74**, 1055-1062.
- Martz, E., and Howell, D. M. (1989).** CTL: virus control cells first and cytolytic cells second? DNA fragmentation, apoptosis and the prelytic halt hypothesis. *Immunol. Today* **10**, 79-86.
- Mathews, M. B., and Peterson, U. (1978).** The low molecular weight RNAs of adenovirus 2 infected cells. *J. Mol. Biol.* **119**, 293-328.
- Mathews, M. B., and Shenk, T. (1991).** Adenovirus virus-associated RNA and translational control. *J. Virol.* **65**, 5657-5662.
- Matsuzaki, N., Hinshaw, V. S., Fields, B. N., and Greene, M. I. (1986).** Cell receptors for the mammalian reovirus: reovirus-specific T-cell hybridomas can become persistently infected and undergo autoimmune stimulation. *J Virol* **60**, 259-266.
- McCormack, S. J., Thomis, D. C., and Samuel, C. E. (1992).** Mechanism of interferon action: identification of a RNA binding domain within the N-terminal region of the human RNA dependent P1/eIF-2 α protein kinase. *Virology* **188**, 47-56.
- McDowell, M. J., Joklik, W. K., Villa-Komaroff, L., and Lodish, H. F. (1972).** Translation of reovirus messenger RNAs synthesized in vitro into reovirus polypeptides by several mammalian cell-free extracts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 2649-2653.
- McIntyre, M. C., Frattini, M. G., Grossman, S. R., and Laimins, L. A. (1993).** Human papillomavirus type 18 E7 protein requires intact Cys-X-X-Cys motif for zinc

binding, dimerization, and transformation but not for Rb binding. *J. Virol.* **67**, 3142-3150.

McMillan, N. A. J., Carpick, B. W., Hollis, B. Toone, W. M., Zamanian-Daryoush, M., Williams, B. R. G. (1995). Mutational analysis of the double-stranded RNA (dsRNA) binding domain of the dsRNA-activated protein kinase, PKR. *J. Biol. Chem.* **270**, 2601-2606.

Meikrantz, W., and Schlegel, R. (1995). Apoptosis and the cell cycle. *J. Cell Biochem.* **58**, 160-174.

Melville, M. W., Hansen, U. J., Freeman, B. C., Welch, W. J., and Katze, M. G. (1997). The molecular chaperone hsp40 regulates the activity of p58IPK, the cellular inhibitor of PKR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 97-102.

Metcalf, P., Cyrklaff, M., and Adrian, M. (1991). The three-dimensional structure of reovirus obtained by cryo-electron microscopy. *Embo J.* **10**, 3129-3136.

Meurs, E., Chong, K., Galabru, J., Thomas, N. S. B., Kerr, I. M., Williams, B. R. G., and Hovanessian, A. G. (1990). Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell* **62**, 379-390.

Meurs, E. K., Galabru, J., Barber, G. N., Katze, M. G., and Hovanessian, A. G. (1993). Tumor suppressor function of the interferon-induced double-stranded activated protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 232-236.

Miller, J. E., and Samuel, C. E. (1992). Proteolytic cleavage of the reovirus sigma 3 protein results in enhanced double-stranded RNA-binding activity: Identification of a repeated basic amino acid motif within the C-terminal binding region. *J. Virol.* **66**, 5347-5356.

Miyamoto, N. G., and Samuel, C. E. (1980). Mechanism of interferon action: Interferon-mediated inhibition of reovirus mRNA translation in the absence of detectable mRNA degradation but in the presence of protein phosphorylation. *Virology* **107**, 461-475.

Mora, M., Partin, K., Bhatia, M., Partin, J., and Carter, C. (1987). Association of reovirus proteins with the structural matrix of infected cells. *Virology* **159**, 265-277.

Morgan, E. M., and Zweering, H. J. (1974). Reovirus morphogenesis: Core-like particles in cells infected at 39°C with wild-type reovirus and temperature-sensitive mutants of groups B and G. *Virology* **59**, 556-565.

Morgan, E. M., and Zweerink, H. J. (1975). Characterization of transcriptase and replicase particles isolated from reovirus infected cells. *Virology* **68**, 455-466.

- Morozov, S. Y.** (1989). A possible relationship of reovirus putative RNA polymerase to polymerases of positive-strand RNA viruses. *Nucleic Acids Res.* **17**, 5394.
- Munemitsu, S. M., and Samuel, C. E.** (1984). Biosynthesis of reovirus-specified polypeptides: Multiplication rate but not yield of reovirus serotypes 1 and 3 correlates with the level of virus-mediated inhibition of cellular protein synthesis. *Virology* **136**, 133-143.
- Munoz, A., Alonso, M. A., and Carrasco, L.** (1985). The regulation of translation in reovirus-infected cells. *J. Gen. Virol.* **66**, 2161-2170.
- Nagata, L., Masri, S. A., Pon, R. T., and Lee, P. W. K.** (1987). Analysis of functional domains on reovirus cell attachment protein sigma 1 using cloned S1 gene deletion mutants. *Virology* **160**, 162-168.
- Nibert, M. L., and Fields, B. N.** (1992). A carboxy-terminal fragment of protein $\mu 1/\mu 1C$ is present in infectious subvirions particles of mammalian reoviruses and is proposed to have a role in penetration. *J. Virol.* **66**, 6408-6418.
- Nibert, M. L., Furlong, D. B., and Fields, B. N.** (1991). Distinct forms of reoviruses and their roles during replication in cells and host. *J. Clin. Invest.* **88**, 727-734.
- Nichols, J. L., Bellamy, A. R., and Joklik, W. K.** (1972a). Identification of the nucleotide sequences of the oligonucleotides present in reovirions. *Virology* **49**, 562-572.
- Nichols, J. L., Hay, A. J., and Joklik, W. K.** (1972b). 5'-Terminal nucleotide sequence of reovirus mRNA synthesized in vitro. *Nature* **235**, 105-107.
- Nilsen, T. W., Maroney, P. A., and Baglioni, C.** (1982). Inhibition of protein synthesis in reovirus-infected HeLa cells with elevated levels of interferon-induced protein kinase activity. *J. Biol. Chem.* **257**, 14593-14596.
- Noble, S., and Nibert, M. L.** (1997). Characterization of an ATPase activity in reovirus cores and its genetic association with core-shell protein $\lambda 1$. *J. Virol.* **71**, 2182-2191.
- Nonoyama, M., Watanabe, Y., and Graham, A. F.** (1970). Defective virions of reovirus. *J. Virol.* **6**, 226-236.
- Ortega, L. G., McCotter, M. D., Henry, G. L., McCormack, S. J., Thomis, D. C., and Samuel, C. E.** (1996). Biochemical and genetic evidence for intermolecular

association of the RNA-dependant protein kinase PKR from human cells. *Virology* **215**, 31-39.

Page, R. K., Fletcher, J., and Rowland, G. N. (1982). Malabsorption syndrome in chickens. *Avian Dis.* **26**, 618-624.

Park, B. H., Matuschke, B., Lavi, E., and Gaulton, G. N. (1994). A point mutation in the env gene of a murine leukemia virus induces syncytium formation and neurologic disease. *J. Virol.* **68**, 7516-7524.

Patel, R. C., and Sen, G. C. (1992). Identification of the double-stranded RNA-binding domain of the human interferon-inducible protein kinase. *J. Biol. Chem.* **267**, 7671-7676.

Patel, R. C., Stanton, P., and Sen, G. C. (1994). Role of the amino-terminal residues of the interferon-induced protein kinase in its activation by double-stranded RNA and heparin. *J. Biol. Chem* **269**, 18593-18598.

Patton, J. T., Wentz, M. J., Xiaobo, J., and Ramig, R. F. (1996). Cis-acting signals that promote genome replication in rotavirus mRNA. *J. Virol.* **70**, 3961-3971.

Paul, R. W., Choi, A. H., and Lee, P. W. K. (1989). The α -anomeric form of sialic acid is the minimal receptor determinant recognized by reovirus. *Virology* **172**, 382-385.

Porath, J. E., Parker, J., Olsson, I., and Belfrage, G. (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**, 598-599.

Prostko, C. R., Dholakia, J. N., Brostrom, M. A., and Brostrom, C. O. (1995). Activation of the double-stranded RNA-regulated protein kinase by depletion of endoplasmic reticular calcium stores. *J. Biol. Chem.* **270**, 6211-6215.

Rodgers, S. E., Barton, E. S., Oberhaus, S. M., Pike, B., Gibson, C. A., Tyler, K. L., and Dermody, T. S. (1997). Reovirus-induced apoptosis of MDCK cells is not linked to viral yield and is blocked by Bcl-2. *J. Virol.* **71**, 2540-2546.

Roner, M. R., Lin, P. N., Nepluev, I., Kong, L. J., and Joklik, W. K. (1995). Identification of signals required for the insertion of heterologous genome segments into the reovirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 12362-12366.

Roner, M. R., Sutphin, L. A., and Joklik, W. K. (1990). Reovirus RNA is infectious. *Virology* **179**, 845-852.

Rosen, L. (1960). Serologic groupings of reovirus by hemagglutination-inhibition. *Am. J. Hyg.* **71**, 242-249.

- Rosen, L.** (1962). Reoviruses in animals other than man. *Ann. N Y Acad. Sci.* **101**, 461-465.
- Rubin, D. H., Kornstein, M. J., and Anderson, A. O.** (1985). Reovirus serotype 1 intestinal infection: a novel replicative cycle with ileal disease. *J Virol* **53**, 391-398.
- Sabin, A. B.** (1959). Reoviruses: a new group of respiratory and enteric viruses formerly classified as ECHO type 10 is described. *Science* **130**, 1387-1389.
- Sakuma, S., and Watanabe, Y.** (1971). Unilateral synthesis of reovirus double-stranded ribonucleic acids. *J. Virol.* **8**, 190-196.
- Sakuma, S., and Watanabe, Y.** (1972). Reovirus replicase-directed synthesis of double-stranded ribonucleic acid. *J. Virol.* **10**, 628-638.
- Samuel, C. E.** (1979). Mechanism of interferon action: phosphorylation of protein synthesis initiation factor eIF-2 in interferon-treated human cells by a ribosome-associated kinase possessing site specificity similar to hemin-regulated rabbit reticulocyte kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 600-604.
- Samuel, C. E.** (1991). Minireview. Antiviral actions of interferon-regulated cellular proteins and their surprising selective antiviral activities. *Virology* **183**, 1-11.
- Samuel, C. E., Duncan, R., Knutson, G. S., and Hershey, J. W. B.** (1984). Mechanism of interferon action: Increased phosphorylation of protein synthesis initiation factor eIF-2 α in interferon-treated, reovirus-infected mouse L929 fibroblasts in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **259**, 13451-13457.
- Sarkar, G., Pelletier, J., Bassel-Duby, R., Jayasuriya, A., Fields, B. N., and Sonenberg, N.** (1985). Identification of a new polypeptide coded by reovirus gene S1. *J Virol* **54**, 720-725.
- Sato, H., Orenstein, J., Dimitrov, D., and Martin, M.** (1992). Cell-to-cell spread of HIV-1 occurs within minutes and may not involve the participation of virus particles. *Virology* **186**, 712-724.
- Schiff, L. A., and Fields, B. N.** (1990). Reoviruses and their replication. In "Virology" (B. N. Fields, and D. M. Knipe, Eds.), pp. 1275-1306. Raven Press, New York.
- Schiff, L. A., Nibert, M. L., Co, M. S., Brown, E. G., and Fields, B. N.** (1988). Distinct binding sites for zinc and double-stranded RNA in the reovirus outer capsid protein sigma 3. *Mol Cell Biol* **8**, 273-283.

- Schmechel, S., Chute, M., Skinner, P., Anderson, R., and Schiff, L.** (1997). Preferential translation of reovirus mRNA by a $\sigma 3$ -dependent mechanism. *Virology* **232**, 62-73.
- Schneider, R. J., and Shenk, T.** (1987). Impact of virus infection on host cell protein synthesis. *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 317-332.
- Schonberg, M., Silverstein, S. C., Levin, D. H., and Acs, G.** (1971). Asynchronous synthesis of the complementary strands of the reovirus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **68**, 505-508.
- Schuerch, A. R., and Joklik, W. K.** (1972). Temperature-sensitive mutants of reovirus. IV. Evidence that anomalous electrophoretic migration behavior of certain double-stranded RNA hybrid species is mutant group-specific. *Virology* **56**, 218-229.
- Scorer, C., Buckhoz, R. G., Clare, J. J., and Romanos, M.** (1993). The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* **136**, 111-119.
- Selb, B., and Weber, B.** (1994). A study of human reovirus IgG and IgA antibodies by ELISA and western blot. *J Virol Methods* **47**, 15-25.
- Seliger, L. S., Giantini, M., and Shatkin, A. J.** (1992). Translational effects and sequence comparisons of the three serotypes of the reovirus S4 gene. *Virology* **187**, 202-210.
- Sharp, T. V., Schwemmle, M., Jeffrey, I., Laing, K., Mellor, H., Proud, C. G., Hilse, K., and Clemens, M. J.** (1993). Comparative analysis of the regulation of the interferon-inducible protein kinase PKR by Epstein-Barr virus RNAs EBER-1 and EBER-2 and adenovirus VA I RNA. *Nucleic Acids Res.* **21**, 4483-4490.
- Sharpe, A. H., Chen, L. B., and Fields, B. N.** (1982). The interaction of mammalian reoviruses with the cytoskeleton of monkey kidney CV-1 cells. *Virology* **120**, 399-411.
- Sharpe, A. H., and Fields, B. N.** (1981a). Reovirus inhibition of cellular DNA synthesis: role of the S1 gene. *J Virol* **38**, 389-392.
- Sharpe, A. H., and Fields, B. N.** (1981b). Reovirus inhibition of cellular RNA and protein synthesis: role of the S4 gene. *Virology* **122**, 381-391.
- Sharpe, A. H., and Fields, B. N.** (1983). Pathogenesis of reovirus infection. In "The Reoviridae" (W. K. Joklik, Ed.). Plenum Publishing Corporation, New York/London.

Shatkin, A. J., and Kozak, M. (1983). Biochemical aspects of reovirus transcription and translation. In "The Reoviridae" (W. K. Joklik, Ed.). Plenum Publishing Corporation.

Shatkin, A. J., and Sipe, J. D. (1968). Single-stranded adenine-rich RNA from purified reoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **59**, 246-253.

Shaw, J. E., and Cox, D. C. (1973). Early inhibition of cellular DNA synthesis by high multiplicity of infections and UV-inactivated reovirus. *J. Virol.* **12**, 704-710.

Shepard, D. A., Ehnstrom, J. G., and Schiff, L. A. (1995). Association of reovirus outer capsid proteins sigma 3 and mu 1 causes a conformational change that renders sigma 3 protease sensitive. *J Virol* **69**, 8180-8184.

Shepard, D. A., Ehnstrom, J. G., Skinner, P. J., and Schiff, L. A. (1996). Mutations in the zinc-binding motif of the reovirus capsid protein delta 3 eliminate its ability to associate with capsid protein mu 1. *J Virol* **70**, 2065-2068.

Shing, M., and Coombs, K. M. (1996). Assembly of the outer capsid requires $\mu 1/\sigma 3$ interaction which are prevented by misfolded $\sigma 3$ protein in temperature-sensitive mutant tsG453. *Virus Research* **46**, 19-29.

Shockett, P., Difilippantonio, M., Hellman, N., and Schatz, D. G. (1995). A modified tetracycline-regulated system provides autoregulatory, inducible gene expression in cultured cells and transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6522-6526.

Silverstein, S. C., Levin, D. H., Schonberg, M., and Acs, G. (1970). The reovirus replicative cycle: conservation of parental RNA and protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **67**, 275-281.

Silverstein, S. C., and Schur, P. H. (1970). Immunofluorescent localization of double-stranded RNA in reovirus-infected cells. *Virology* **41**, 564-566.

Skup, D., and Millward, S. (1980a). mRNA capping enzymes are masked in reovirus progeny subviral particles. *J. Virol.* **34**, 490-496.

Skup, D., and Millward, S. (1980b). Reovirus-induced modification of cap-dependent translation in infected L cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 152-156.

Skup, D., Zarbl, H., and Millward, S. (1981). Regulation of translation in L-cells infected with reovirus. *J Mol Biol* **151**, 35-55.

- Smith, R. E., Zweerink, H. J., and Joklik, W. K.** (1969). Polypeptide components of virions, top components and cores of reovirus type 3. *Virology* **39**, 791-810.
- Sonenberg, N.** (1987). Regulation of translation by poliovirus. *Adv. Virus. Res.* **33**, 175-203.
- Sonenberg, N.** (1990). Measures and countermeasures in the modulation of initiation factor activities by viruses. *The New Biologist* **2**, 402-409.
- Sonenberg, N., Skup, D., Trachsel, H., and Millward, S.** (1981). In vitro translation in reovirus- and poliovirus-infected cell extracts. Effects of anti-cap binding protein monoclonal antibody. *J Biol Chem* **256**, 4138-4141.
- Sreekrishna, K., Nelles, L., Potenz, R., Cruze, J., Mazzaferro, P., Fish, W., Fuke, M., Holden, K., Phelps, D., Wood, P., and Parker, K.** (1989). High-level expression, purification, and characterization of recombinant human Tumor Necrosis Factor synthesized in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry* **28**, 4117-4125.
- St. Johnston, D., Brown, N. H., Gall, J. G., and Jantsch, M.** (1992). A conserved double-stranded RNA-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 10979-10983.
- Staeheli, P., and Haller, O.** (1987). Interferon-induced Mx protein: a mediator of cellular resistance to influenza virus. *Interferon* **8**, 1-23.
- Stoltzfus, C. M., Shatkin, A. J., and Banerjee, A. K.** (1973). Absence of polyadenylic acid from reovirus messenger ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* **23**, 7993-7998.
- Strong, J. E., and Lee, P. W. K.** (1996). The v-erbB oncogene confers enhanced cellular susceptibility to reovirus infection. *J Virol* **70**, 612-616.
- Strong, J. E., Leone, G., Duncan, R., Sharma, R. K., and Lee, P. W. K.** (1991). Biochemical and biophysical characterization of the reovirus cell attachment protein sigma 1: evidence that it is a homotrimer. *Virology* **184**, 23-32.
- Strong, J. E., Tang, D., and Lee, P. W. K.** (1993). Evidence that the epidermal growth factor receptor on host cells confers reovirus infection efficiency. *Virology* **197**, 405-411.
- Sturzenbecker, L. J., Nibert, M., Furlong, D., and Fields, B. N.** (1987). Intracellular digestion of reovirus particles requires a low pH and is an essential step in the viral infectious cycle. *J Virol* **61**, 2351-2361.

- Taber, R., Alexander, V., and Whitford, W.** (1976). Persistent reovirus infection of CHO cells resulting in virus resistance. *J. Virol.* **17**, 513-525.
- Theil, K. W., and McCloskey, C. M.** (1991). Rabbit syncytium virus is a Kemerovo serogroup orbivirus. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 2059-2062.
- Theil, K. W., and Saif, L. J.** (1985). In vitro detection of porcine rotavirus-like virus (Group B rotavirus) and its antibody. *J. Clin. Microbiol.* **1**, 844-846.
- Thimmappaya, B. C., Weinberger, C., Schneider, R. J., and Shenk, T.** (1982). Adenovirus VA I RNA is required for efficient translation of viral mRNAs at late times after infection. *Cell* **31**, 543-551.
- Thomis, D. C., and Samuel, C. E.** (1995). Mechanism of interferon action: characterization of the intermolecular autophosphorylation of PKR, the interferon-inducible, RNA-dependent protein kinase. *J. Virol.* **69**, 5195-5198.
- Tillotson, L., and Shatkin, A. J.** (1992). Reovirus polypeptide sigma 3 and N-terminal myristoylation of polypeptide mu 1 are required for site-specific cleavage to mu 1C in transfected cells. *J. Virol.* **66**, 2180-2186.
- Tosteson, M. T., Nibert, M. L., and Fields, B. N.** (1993). Ion channels induced in lipid bilayers by subviral particles of the nonenveloped mammalian reoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10549-10552.
- Toyoda, H., Kohara, M., Kataoka, Y., Sugauma, T., Omata, T., Imura, N., and Nomoto, A.** (1984). Complete nucleotide sequences of all three poliovirus serotype genomes. Implication for genetic relationship, gene function and antigenic determinants. *J. Mol. Biol.* **174**, 561-585.
- Toyoda, H., Nicklin, M. J. H., Murray, M. G., Anderson, C. W., Dunn, J. J., Studier, F. W., and Wimmer, E.** (1986). A second virus-encoded protease involved in proteolytic processing of poliovirus polyprotein. *Cell* **45**, 761-770.
- Tyler, K. L., Mann, M. A., Fields, B. N., and Virgin, H. W. T.** (1993). Protective anti-reovirus monoclonal antibodies and their effects on viral pathogenesis. *J. Virol.* **67**, 3446-3453.
- Tyler, K. L., Squier, M. K., Rodgers, S. E., Schneider, B. E., Oberhaus, S. M., Grdina, T. A., Cohen, J. J., and Dermody, T. S.** (1995). Differences in the capacity of reovirus strains to induce apoptosis are determined by the viral attachment protein sigma 1. *J. Virol.* **69**, 6972-6979.
- Tyler, K. L., Squier, M. K. T., Brown, A. L., Pike, B., Willis, D., Oberhaus, S. M., Dermody, T. S., and Cohen, J. J.** (1996). Linkage between reovirus-induced

apoptosis and inhibition of cellular DNA synthesis: role of the S1 and M2 genes. *J. Virol.* **70**, 7984-7991.

Tyler, K. L., Virgin, H. W. T., Bassel-Duby, R., and Fields, B. N. (1989). Antibody inhibits defined stages in the pathogenesis of reovirus serotype 3 infection of the central nervous system. *J Exp Med* **170**, 887-900.

Vasquez, C., and Kleinschmidt, A. K. (1968). Electron microscopy of RNA strands released from individual reovirus particles. *J. Mol. Biol.* **34**, 137-147.

Virgin, H. W. T., Bassel-Duby, R., Fields, B. N., and Tyler, K. L. (1988). Antibody protects against lethal infection with the neurally spreading reovirus type 3 (Dearing). *J Virol* **62**, 4594-4604.

Virgin, H. W. T., Mann, M. A., and Tyler, K. L. (1994). Protective antibodies inhibit reovirus internalization and uncoating by intracellular proteases. *J Virol* **68**, 6719-6729.

Vonderfecht, S. L., Huber, A. C., Eiden, J., Mader, L. C., and Yoken, R. H. (1984). Infectious diarrhea of infant rats produced by rotavirus-like agent. *J. Virol.* **52**, 94-98.

Wang, Q., Bergeron, J., Mabrouk, T., and Lemay, G. (1996). Site-directed mutagenesis of the double-stranded RNA binding domain of bacterially-expressed $\sigma 3$ reovirus protein. *Virus Research* **41**, 141-151.

Watanabe, Y., Prevec, L., and Graham, A. F. (1967). Specificity in transcription of the reovirus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **58**, 1040-1047.

Watson, J. C., Chang, H. W., and Jacobs, B. L. (1991). Characterization of a vaccinia virus-encoded double-stranded RNA-binding protein that may be involved in inhibition of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Virology* **185**, 206-216.

Wegner, G. H. (1990). Emerging application of the methylotrophic yeasts. *FEMS Microbiology Reviews* **87**, 279-284.

Weiner, H. L., and Fields, B. N. (1977). Neutralization of reovirus: the gene responsible for the neutralization antigen. *J. Exp. Med.* **146**, 1305-1310.

Weiner, H. L., Powers, M. L., and Fields, B. N. (1980). Absolute linkage of virulence and central nervous system tropism of reovirus to viral hemagglutinin. *J. Infect. Dis.* **141**, 609-616.

- Wentz, M. J., Patton, J. T., and Ramig, R. F.** (1996). The 3'-terminal consensus sequence of rotavirus mRNA is the minimal promotor of negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* **70**, 7833-7841.
- Wetzel, J. D., Chappell, J. D., Fogo, A. B., and Dermody, T. S.** (1997a). Efficiency of viral entry determines the capacity of murine erythro leukemia cells to support persistent infection by mammalian reoviruses. *J. Virol.* **71**, 299-306.
- Wetzel, J. D., Wilson, G. J., Baer, G. S., Dunnigan, L. R., Wright, J. P., Tang, D. S. H., and Dermody, T. S.** (1997b). Reovirus variants selected during persistent infection of L cells contain mutations in the viral S1 and S4 genes and are altered in viral disassembly. *J. Virol.* **71**, 1362-1369.
- Whitaker-Dowling, P. A., and Youngner, J. S.** (1984). Characterization of a specific kinase inhibitory factor produced by vaccinia virus which inhibits the interferon-induced protein kinase activity. *Virology* **137**, 171-181.
- Wiebe, M. E., and Joklik, W. K.** (1975). The mechanism of inhibition of reovirus replication by interferon. *Virology* **66**, 229-240.
- Wilcox, G. E., and Compans, R. W.** (1982). Cell fusion induced by Nelson Bay Virus. *Virology* **123**, 312-322.
- Wilcox, G. E., and Compans, R. W.** (1983). Characterization of Nelson Bay Virus and virus-induced cell fusion. In "Double-Stranded RNA Viruses" (R. W. Compans, and D. H. L. Bishop, Eds.), pp. 391-403. Elsevier, NY.
- Wilson, G. J., Wetzel, J. D., Puryear, W., Bassel-Duby, R., and Dermody, T. S.** (1996). Persistent reovirus infection of L cells select mutations in viral attachment protein $\sigma 1$ that alter oligomer stability. *J. Virol.* **70**, 6598-6606.
- Winton, J. R., Lannan, C. N., Fryer, J. L., Hedrick, R. P., Meyers, T. R., Plumb, J. A., and Yamamoto, T.** (1987). Morphological and biochemical properties of four members of a novel group of reoviruses isolated from aquatic animals. *J. Gen. Virol.* **68**, 353-364.
- Wolf, J. L., Rubin, D. H., Finberg, R., Kauffman, R. S., Sharpe, A. H., Trier, J. S., and Fields, B. N.** (1981). Intestinal M cells: a pathway for entry of reovirus into the host. *Science* **212**, 471-472.
- Yamakawa, M., Furuichi, Y., and Shatkin, A. J.** (1982). Reovirus transcriptase and capping enzymes are active in intact virions. *Virology* **118**, 157-168.

- Yeung, M. C., Lim, D., Duncan, R., Shahrabadi, M. S., Cashdollar, L. W., and Lee, P. W. K.** (1989). The cell attachment proteins of type 1 and type 3 reovirus are differentially susceptible to trypsin and chymotrypsin. *Virology* **170**, 62-70.
- Yue, Z., and Shatkin, A. J.** (1996). Regulated, stable expression and nuclear presence of reovirus double-stranded RNA-binding protein $\sigma 3$ in HeLa cells. *J. Virol.* **70**, 3497-3501.
- Zarbl, H., Hastings, K. E., and Millward, S.** (1980a). Reovirus core particles synthesize capped oligonucleotides as a result of abortive transcription. *Arch Biochem Biophys* **202**, 348-360.
- Zarbl, H., and Millward, S.** (1983). The reovirus multiplication cycle. In "The Reoviridae" (W. K. Joklik, Ed.), pp. 107-195. Plenum Publishing Corporation., New York/London.
- Zarbl, H., Skup, D., and Millward, S.** (1980b). Reovirus progeny subviral particles synthesize uncapped mRNA. *J Virol* **34**, 497-505.
- Zweerink, H. J.** (1974). Multiple forms of SS-DS RNA polymerase activity in reovirus-infected cells. *Nature* **247**, 313-315.
- Zweerink, H. J., and Joklik, W. K.** (1970). Studies on the intracellular synthesis of reovirus-specified proteins. *Virology* **41**, 501-518.