

2M11.3332.9

Université de Montréal

**Étude du rôle de l'activité glycosidase de la protéine virale $\sigma 1$ dans l'infectivité
du réovirus**

par
Nicholas Svitek



**Département de microbiologie et immunologie
Faculté de médecine**

**Mémoire présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise ès sciences
en microbiologie et immunologie**

Décembre 2004

© Nicholas Svitek, 2004



W

4

U58

2005

v. 128

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Étude du rôle de l'activité glycosidase de la protéine virale $\sigma 1$ dans l'infectivité
du réovirus**

présenté par :

Nicholas Svitek

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Éric Cohen

.....
président-rapporteur

Guy Lemay

.....
directeur de recherche

Peter Tijssen

.....
membre du jury (INRS-Institut Armand-Frappier)

*By definition, to exist,
successful viruses must always be
one step ahead of their host.*

Principles of Virology

*Celui qui se perd dans sa passion
est moins perdu que celui qui perd sa passion.*

Saint-Augustin

354-430

Résumé

La protéine $\sigma 1$ du réovirus de mammifère agit comme protéine d'attachement. Il a été démontré par des études *in vitro* que cette protéine possède aussi une activité glycosidase et mucinase. Une hypothèse suggère que cette activité puisse permettre au virus de franchir l'importante couche de mucine couvrant les cellules de l'épithélium intestinal où l'infection primaire a principalement lieu. C'est la forme ISVP (*infectious subviral particle*) du réovirus qui possède la propriété de dégrader la mucine, car la protéine $\sigma 1$ se retrouve à ce moment sous une forme relâchée lui permettant d'exercer son activité. Les ISVPs sont normalement générées à partir des virions par l'activité protéolytique au niveau de l'intestin et peuvent aussi être obtenues par digestion protéolytique *in vitro*. Grâce à l'analyse de séquence en acides aminés de $\sigma 1$ et à des études de mutagenèse dirigée, il a été possible d'identifier le site actif permettant à $\sigma 1$ de dégrader la mucine. Les acides aminés responsables de l'activité enzymatique de $\sigma 1$ sont le glutamate en position 36 et l'aspartate en position 54 dans la partie N-terminale de la protéine. Bien que l'effet de mutations dans le site catalytique de $\sigma 1$ ait été étudié *in vitro*, l'effet de ces mutations n'a pas été déterminé sur une particule virale entière. Pour ce faire, il est possible grâce à une technique de recapsidation *in vitro* de remplacer la protéine $\sigma 1$ sauvage du virus par une protéine $\sigma 1$ recombinante. Il est possible par la suite d'observer l'effet de substitution d'acides aminés sur l'infection virale de cellules exprimant ou non la mucine. Dans la présente étude, la protéine $\sigma 1$ sauvage du réovirus de sérotype 3 a été remplacée par des protéines $\sigma 1$ mutantes produites dans des cellules d'insectes grâce à un système d'expression à baculovirus. Toutes ces protéines permettent de maintenir l'infection normale des virions dans des fibroblastes de souris. Les particules possédant une substitution d'acide aminé dans le site catalytique de la protéine $\sigma 1$ ont toutefois une infectivité réduite sur des cellules épithéliales MDCK exprimant de la mucine à leur surface, en accord avec l'hypothèse de départ.

Mots clés : réovirus, infectivité, recapsidation, $\sigma 1$, activité glycosidase, mucine, protéine d'attachement

Summary

The mammalian orthoreovirus $\sigma 1$ protein is responsible for viral attachment to the host cell. It was shown by *in vitro* studies that this protein also possesses a glycosidase and mucinolytic activity. One hypothesis suggests that this activity enables the virus to cross the important mucus layer covering the cells of the intestinal epithelium where the primary infection mainly takes place. It is the ISVP (infectious subviral particle) form of reovirus that has the ability to degrade mucin because $\sigma 1$ protein has an extended conformation at the surface of these particles, unmasking its enzymatic activity. Such ISVPs are normally generated from virions by proteolytic activity in the intestine of infected hosts and can be obtained by *in vitro* proteolytic digestion. Sequence analysis and site-directed mutagenesis studies have previously allowed to identify the active site of $\sigma 1$ as glutamic acid 36 and aspartic acid 54 in the N-terminal part of the protein. Although the effect of mutations in the catalytic site of $\sigma 1$ has been studied *in vitro*, the effect of these mutations has not yet been determined on a whole viral particle. In the present study, the wild-type $\sigma 1$ protein of reovirus type 3 or mutant forms harboring amino acids substitution at either amino acid of the catalytic site were produced in insect cells using a baculovirus expression system. An *in vitro* recoating technique was then used to replace the wild-type viral $\sigma 1$ protein by either baculovirus-expressed recombinant $\sigma 1$ protein. All forms of the $\sigma 1$ protein were able to support a normal viral infection in mouse L cells fibroblasts. However, viral particles harboring the mutant forms of $\sigma 1$ were less infectious on epithelial MDCK cells expressing mucin at their surface, in accordance with the initial hypothesis.

Keywords: reovirus, infectivity, recoating, $\sigma 1$, glycosyl hydrolase, mucin, viral attachment protein

Table des matières

Résumé	iv
Summary	v
Liste des figures	ix
Liste des tableaux	xi
Liste des abréviations et des sigles	xii
Remerciements	xiv
1. Revue de littérature	1
1.1 Généralités	1
1.1.1 Classification de réovirus	1
1.1.2 Transmission de réovirus	1
1.1.3 Les différents sérotypes de réovirus	2
1.1.4 Épidémiologie et tropisme du réovirus	2
1.1.5 Pathogenèse virale	3
1.1.6 Réovirus comme agent oncolytique	5
1.2 Organisation structurale de réovirus	9
1.2.1 Les capsides interne et externes	9
1.2.2 Les trois formes de particules	9
1.2.3 Organisation génomique de réovirus	12
1.2.4 Organisation protéomique de réovirus	13
1.2.5 Fonctions et propriétés des protéines virales	13
1.2.5.1 Protéines de la capsid externe	14
1.2.5.2 Protéines de la capsid interne	15
1.2.5.3 Protéines non structurales	16
1.3 Cycle de réplication	18
1.3.1 Attachement	18
1.3.2 Pénétration	19
1.3.3 Transcription du génome	23
1.3.4 Réplication du génome et assemblage	24
1.3.5 Relâche	25

1.4 La protéine $\sigma 1$	26
1.4.1 Structure de la protéine $\sigma 1$	26
1.4.2 Formation du trimère	27
1.4.3 Liaison à la cellule	28
1.4.4 Ancrage de $\sigma 1$ dans le virion	31
1.4.5 Régions flexibles au sein de $\sigma 1$	32
1.4.6 Rôle de $\sigma 1$ dans la pathogenèse	32
1.4.7 La protéine $\sigma 1$ et l'apoptose	34
1.4.8 Activité mucinolytique	35
2. Objectifs du projet	38
3. Matériel et Méthodes	40
3.1 Matériel	40
3.2 Méthodes	41
3.2.1 Culture cellulaire	41
3.2.2 Production de baculovirus recombinant	42
3.2.2.1 Amplification et mutagenèse dirigée du segment <i>S1</i>	43
3.2.2.2 Transposition du segment <i>S1</i> dans le bacmide	43
3.2.2.3 Isolement du bacmide recombinant	44
3.2.2.4 Transfection des bacmides recombinants dans des cellules <i>d'insectes Sf9</i>	45
3.2.3 Production des protéines $\mu 1$, $\sigma 3$ et $\sigma 1$ à l'aide du système baculovirus	45
3.2.4 Production d'inoculum de réovirus infectieux	46
3.2.5 Titrage viral	47
3.2.6 Production et purification de réovirus en grande quantité	48
3.2.7 Recapsidation <i>in vitro</i>	49
3.2.8 Production d'ISVP à partir des <i>cores</i> recapsidés	49
3.2.9 Immunobuvardage et immunoprécipitation	50
3.2.9.1 Marquage métabolique	50
3.2.9.2 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (<i>SDS-PAGE</i>)	50
3.2.9.3 Immunobuvardage de type <i>Western</i>	51

3.2.9.4 <i>Immunoprécipitation</i>	52
3.2.10 Test d'infectivité.....	52
3.2.10.1 <i>Analyse de la production de protéines virales</i>	53
3.2.10.2 <i>Analyse de l'activité mucinolytique par titrage</i>	53
4. Résultats.....	55
4.1 Mutagenèse du site actif et clonage du segment S1.....	55
4.2 Expression des protéines $\mu 1$, $\sigma 3$ et $\sigma 1$	58
4.3 Recapsidation <i>in vitro</i>	60
4.4 Infectivité des particules recapsidées sur cellules L929.....	63
4.5 Production d'ISVPs à partir de cores recapsidés	67
4.6 Infectivité des ISVPs portant les différents mutants de $\sigma 1$	68
4.7 Infectivité des ISVPs dans les cellules Caco-2.....	70
4.8 Infectivité des ISVPs dans les cellules épithéliales MDCK.....	72
5. Discussion.....	77
5.1 Expression des protéines $\mu 1$, $\sigma 3$ et $\sigma 1$	77
5.2 Recapsidation	79
5.3 Effet des mutations sur la protéine $\sigma 1$	80
5.4 Infectivité des particules recapsidées sur les cellules L929	83
5.5 Infectivité des particules recapsidées sur les cellules Caco-2.....	84
5.6 Infectivité des particules recapsidées sur les cellules MDCK-MUC1	85
5.7 Perspectives	88
5.8 Conclusions	90
Références.....	91

Liste des figures

Figure 1. Les trois formes de particules de réovirus.	11
Figure 2. Utilisation du transport transépithéliale des cellules M lors d'une infection par réovirus	19
Figure 3. Initiation de l'infection du réovirus	22
Figure 4. Microscopie électronique de la protéine $\sigma 1$ de réovirus. Q : Queue, T : Tête	26
Figure 5. Comparaison de la structure de la protéine $\sigma 1$ de réovirus et de la protéine <i>fiber</i> de l'adénovirus	27
Figure 6. Domaine impliqué dans la liaison à JAM1	29
Figure 7. Localisation des domaines importants pour la liaison cellulaire et l'ancrage aux particules virales	31
Figure 8. Activité mucinolytique du réovirus.	37
Figure 9. Schéma du système d'expression <i>Bac-to-Bac</i> [®]	42
Figure 10. Amplification du segment S1 à partir de pFastBac-S1 et vérification de la perte d'un site <i>XhoI</i> chez les mutants E36D et E36Q.	57
Figure 11. Expression des protéines $\mu 1$ et $\sigma 3$	59
Figure 12. Expression des protéines $\sigma 1$ dans des cellules Tn High Five.	60
Figure 13. Recapsidation <i>in vitro</i>	63
Figure 14. Infectivité des cores recapsidés (r-Virions) dans les cellules L929.	66
Figure 15. Formation d'ISVPs à partir de cores recapsidés.	68
Figure 16. Infectivité des r-ISVPs portant les différents mutants de $\sigma 1$	69
Figure 17. Infectivité des r-virions et des r-ISVPs dans les cellules Caco-2.	71
Figure 18. Effet d'une couche de mucine sur l'infectivité des virions et ISVPs. ..	73
Figure 19. Effet d'une couche de mucine sur l'infectivité des r-ISVPs portant les différents mutants de $\sigma 1$	75
Figure 20. Effet d'une couche de mucine sur l'infectivité des r-Virions et r-ISVPs portant la protéine $\sigma 1$ de type sauvage ou contenant la substitution d'acide aminé E36Q.	76

Figure 21. Profil d'hydrophobicité des protéines $\sigma 1$ 82

Liste des tableaux

Tableau I. Propriétés des trois formes de particules virales.....	11
Tableau II. Fonctions des protéines de réovirus.	17

Liste des abréviations et des sigles

%	Pourcentage
μ	Micro (10 ⁻⁶)
°C	Degré Celsius
μg	Microgramme
μL	Microlitre
μM	Micromolaire
Å	Angstrom
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate
db	Double-brin
DOC	Déoxycholate
DR	<i>Death receptor</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
eIF	<i>Elongation initiation factor</i>
Hsp	<i>Heat shock protein</i>
IFN-β	Interféron-β
ISVP	<i>Intermediate (ou infectious) subviral particle</i>
JAM1	<i>Junctional Adhesion Molecule 1</i>
kDa	KiloDalton
L	Litre
LB	Luria-Bertani
mA	Milliampère
MDCK	<i>Madin Darby Canine Kidney</i>
MEM	<i>Minimum essential medium</i>

mL	Millilitre
NBT	<i>Nitro-Blue Tetrazolium</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
pb	paire de bases
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PKR	Protéine kinase dépendante des ARNs bicaténaires
rpm	<i>Rotations per minute</i>
sb	Simple-brin
SDS	Sodium dodécylsulfate
T1L	Type 1 Lang
T2J	Type 2 Jones
T3A	Type 3 Abney
T3D	Type 3 Dearing
T4N	Type 4 Ndelle
TAE	Tris-acétate EDTA
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
V	Volt
WT	<i>Wild-type</i> (type sauvage)

Remerciements

Je tiens premièrement à remercier mon directeur de recherche, le Dr. Guy Lemay, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir véhiculé les nombreux conseils techniques et scientifiques pour la réussite de ce passionnant projet. J'aimerais aussi remercier le Dr. Martin Bisailon pour avoir mis sur ma route le Dr. Lemay. J'étais orphelin comme le réovirus et j'ai été chanceux de trouver un hôte idéal pour pouvoir grandir scientifiquement et enrichir mes connaissances en virologie moléculaire.

Je veux exprimer ma gratitude envers Carole Danis qui a été d'une aide précieuse tout au long de ce projet. J'ai aussi été honoré d'avoir à mes côtés une persévérante étudiante, Sandra Fernandes, qui a travaillé sans relâche pour obtenir les protéines recombinantes indispensables au projet. J'aimerais remercier le Dr. Joseph M. Pilewski, de la Pittsburgh University, pour nous avoir fourni les cellules MDCK exprimant la mucine sans lesquelles l'étude n'aurait pu être menée. J'aimerais aussi souligner la générosité du Dr. Max L. Nibert de la Harvard Medical School qui nous a donné le baculovirus recombinant exprimant les protéines $\mu 1$ et $\sigma 3$ de réovirus. Un merci particulier à Sapha Barkati, Carole Danis, Penny Rudd, Mélanie Welman et Salvatore Motillo pour les emprunts occasionnels de réactifs. Un merci à Étienne Rouault pour les moments passionnants à discuter de science, de théologie et d'évolution.

Les nombreuses discussions avec vous tous autour du café ont été très agréables et très stimulantes. Merci à mes parents et amis qui m'ont encouragé tout au long de cette maîtrise. Finalement, j'aimerais remercier tout le monde du laboratoire de virologie pour votre oreille attentive et votre soutien et surtout, pour avoir enduré mes blagues.

À ma mère Marie-Rose qui a su aller au bout de ses rêves.
Elle a été un modèle de persévérance et d'accomplissement pour moi.

1. Revue de littérature

1.1 Généralités

1.1.1 Classification de réovirus

Le réovirus de mammifère, qui sera traité dans ce travail, fait partie de la famille des *Reoviridae*. Ce groupe de virus est caractérisé par des virions ne possédant pas d'enveloppe lipidique et étant formés d'une double capsidie protéique. Un autre trait important définissant la famille des *Reoviridae* est le génome viral composé d'ARN bicaténaire segmenté (Nibert, 2001).

1.1.2 Transmission de réovirus

Le réovirus de mammifères, appelé plus communément réovirus, tient son préfixe (réo) du fait qu'initialement ce virus était isolé d'échantillons respiratoires et entériques de patients humains qui ne présentaient pas ou peu de symptômes (Nibert, 2001; Sabin, 1959). C'est pour cette raison que ce virus, qui se transmet par voie fécale/orale et par voie respiratoire, a été nommé le virus respiratoire et entérique orphelin; en anglais *Respiratory and Enteric Orphan Virus* où le terme orphelin désigne ici le fait qu'on ne connaissait pas de pathologies chez l'humain pouvant être associées à ce virus.

1.1.3 Les différents sérotypes de réovirus

Ce virus se retrouve dans la nature sous quatre sérotypes différents. Le premier étant le type 1 Lang ou T1L qui est isolé d'enfants sains ne présentant aucun symptôme. Ensuite on retrouve le type 2 Jones ou T2J qui est isolé principalement d'enfants présentant des symptômes gastro-entériques. On trouve aussi le type 3 Abney ou T3A qui a été isolé de patients présentant des signes cliniques respiratoires (Rosen, 1960) ainsi que le type 3 Dearing ou T3D qui provient de patients présentant quant à eux des symptômes gastro-intestinaux (Nibert, 2001). Un nouveau sérotype a été ajouté dans le genre des orthoreovirus, le type 4 Ndelle ou T4N qui a été isolé du foie et du cerveau de *Mus musculoides* au Cameroun en 1974. Ne réagissant avec aucun anticorps spécifique aux trois premiers sérotypes de réovirus ce nouveau virus n'a pas été initialement inclus dans le genre des orthoréovirus. Par contre, des études récentes ont démontré que ce virus est bel et bien un orthoréovirus qui possède, par exemple, une homologie de 97% au niveau de la polymérase $\lambda 3$, une protéine hautement conservée dans le genre orthoréovirus de mammifères (Attoui, 2001). Bien que ces souches sont les principaux prototypes de réovirus, il en existe bien d'autres (Nibert, 2001).

1.1.4 Épidémiologie et tropisme du réovirus

Le réovirus est ubiquitaire (Matsuura, 1993; Muscillo, 1997). Près de soixante-dix pour cent de la population possède des anticorps contre le réovirus démontrant une infection courante par ce virus dans la population. Le réovirus de mammifère est

pantropique (**Fukutomi**, 1996; **Kokubu**, 1993; Mochizuki, 1992; **Nason**, 2001; **Nibert**, 2001; **Rosen**, 1962). En effet, ce virus peut aussi bien infecter des fibroblastes et des cellules épithéliales provenant de différents tissus, des cellules du myocarde, des cellules neuronales, et ce chez différents hôtes mammifères. Parmi les mammifères ayant été identifiés comme étant capables de permettre au réovirus de se répliquer on retrouve bien entendu l'humain mais aussi la souris, le porc, le chien et le chat.

1.1.5 Pathogenèse virale

Le réovirus ne cause pas de pathologies importantes chez l'humain si ce n'est que les quelques infections bénignes des systèmes digestif et respiratoire (**Giordano**, 2002; **Nibert**, 2001). Par contre, il a été rapporté que le réovirus pouvait être une cause probable d'atrésie des voies biliaires chez le nouveau né, ce qui provoque des lésion au niveau du foie à cause de l'obstruction des canaux qui véhiculent la bile du foie à l'intestin grêle (**Bangaru**, 1980; **Glaser**, 1984; **Kahn**, 2004; **Morecki**, 1984; **Organ**, 1998; **Richardson**, 1994; **Sokol**, 2001; **Tyler**, 1998). Par ailleurs, il a été rapporté que le réovirus peut être responsable de rare cas de méningites chez le nouveau-né (**Johanson**, 1996). Lorsqu'on inoculait des cellules avec le liquide céphalorachidien de quelques enfants présentant des symptômes de méningite, on pouvait isoler des particules virales ayant une morphologie similaire au réovirus. Des essais de neutralisation ont confirmé par la suite que ces cas de méningites étaient bel et bien dus à une infection par réovirus (**Hermann**, 2004). Tout récemment, une étude a démontré qu'un réovirus de sérotype 3 avait causé une méningite chez un nouveau-né âgé de six

semaines. Observation intéressante, la séquence du gène S1 était assez divergente pour ne pas pouvoir le classer dans les deux souches connues du sérotype 3, Abney et Dearing. (Tyler, 2004).

Chez des modèles animaux comme la souris, le réovirus peut s'avérer très pathogène. Chez la souris, le réovirus démontre un fort neurotropisme et par le fait même est responsable de neuropathologies s'apparentant aux méningites et encéphalites retrouvées chez l'humain. Bien qu'étant neurotropique chez la souris, la voie empruntée pour atteindre le système nerveux central est différente dépendant du sérotype infectant la souris. Si la souris est infectée par le réovirus de sérotype 1 Lang, le virus se propagera au cerveau en empruntant la route hématogène et causera une hydrocéphalie (Forrest, 2003; Tyler, 1986). Par contre, si la souris est infectée par le réovirus de sérotype 3 Dearing, le virus se propagera à l'encéphale par voie neuronale causant une encéphalite mortelle (Forrest, 2003). Le réovirus est aussi utilisé comme modèle pour étudier les myocardites virales. Il a été démontré que l'induction et la sensibilité à l'IFN- β sont des déterminants importants de la pathogenèse du réovirus au niveau du myocarde murin (Azzam-Smoak, 2002). Une récente étude fait mention de l'association du segment M2 dans la pathogenèse de réovirus au niveau du foie chez la souris. Ce segment serait associé au *oily fur syndrome*, phénotype fortement associé à un mauvais fonctionnement du système hépato-biliaire (Derien, 2003). Bien que la protéine d'attachement $\sigma 1$ soit le principal déterminant de la pathogénicité de réovirus, les protéines $\sigma 1s$ et $\lambda 1$ sont impliquées aussi dans la létalité du virus (Mann et Tyler, 2002). Par ailleurs, des facteurs liés à l'âge peuvent influencer une infection par le

réovirus. La souris adulte est moins propice que la souris nouveau-né à développer une infection menant à une encéphalite mortelle (**Mann et Knipe, 2002**).

1.1.6 Réovirus comme agent oncolytique

La faible pathogénicité du réovirus de mammifère chez l'humain adulte suggère une utilisation thérapeutique possible pour ce virus. Une des premières études qui a laissé suggérer l'utilisation potentielle de réovirus dans la thérapie anticancéreuse est lors d'une expérience où des cellules fibroblastiques de souris normalement résistante à une infection par réovirus devenaient permissives à l'infection une fois transformées par le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) (**Strong, 1993**). Cette meilleure infectivité du réovirus n'est pas le résultat d'une meilleure liaison du virus à la cellule mais bien à l'effet de l'EGFR sur la transduction des signaux cellulaires rendant l'infection possible (**Strong, 1993**). Par contre, il semble que le réovirus possède une certaine affinité pour l'EGFR et que cette liaison serait dans la partie extracellulaire N-terminale de la protéine, à un endroit différent de la liaison de l'EGF (**Tang, 1993**). L'amélioration de l'infection par réovirus dans des cellules hébergeant l'EGFR est dû à la forme activée de cette protéine puisque lorsque son activité kinase n'est pas fonctionnelle, on ne peut voir une augmentation dans l'infectivité du virus (**Strong, 1996**).

Pour vérifier que la forme activée de l'EGFR est responsable de la meilleure infectivité de réovirus indépendamment de la liaison de ce dernier au récepteur, une

étude utilisant des cellules hébergeant l'oncogène v-erbB indique bel et bien que la liaison de réovirus sur EGFR n'est pas requis pour une meilleure infectivité. La protéine codée par v-erbB possède une structure apparentée à l'EGFR sans avoir la partie N-terminale extracellulaire (Strong, 1996). De plus cette protéine possède une activité tyrosine kinase constitutive ce qui démontre qu'il doit y avoir en place une activation dans cette voie de signalisation cellulaire.

Des études ont été menées dans l'optique de caractériser plus en détail cette voie de signalisation en relation avec une meilleure infectivité du réovirus. Il a été observé que le réovirus se réplique et lyse mieux les cellules dont la voie de signalisation Ras est activé (Strong, 1998). En effet, des cellules NIH-3T3 normalement résistante à l'infection sont devenues susceptibles au réovirus suite à une transformation avec une forme activé de Sos ou Ras. Lorsque les cellules transformées avec ces deux oncogènes étaient infectées par le réovirus, la phosphorylation de PKR était inhibé (Strong, 1998). La protéine PKR est une sérine-thréonine protéine kinase composée d'un domaine régulateur dans sa partie N-terminale et d'un domaine catalytique dans sa partie C-terminale. C'est une protéine qui est présente normalement en faible quantité sous forme inactive dans des cellules saines. Lorsque cette protéine est en présence d'ARN bicaténaire, PKR peut s'y lier par son domaine N-terminal et une autophosphorylation de sa partie C-terminale à lieu lorsque celle-ci est sous forme dimérique. Cette phosphorylation cause un changement de conformation de son domaine catalytique qui lui permet entre autres de phosphoryler le facteur d'élongation de la traduction eIF2 α sur la sérine 51. Ceci résulte en une diminution de la synthèse protéique puisque la

forme phosphorylée de eIF2 α se lie de façon irréversible avec le facteur d'élongation eIF2B, empêchant eIF2 α de véhiculer les ARNs de transfert pour la poursuite de la synthèse protéique (Samuel, 2001). Puisque, dans les cellules NIH-3T3 transformées avec Ras ou Sos, la protéine PKR n'est plus phosphorylée, son activité de phosphorylation de la sous-unité α du facteur de traduction eIF2 est également réduite et ne peut donc plus se lier de façon irréversible à eIF2B. Ainsi, la synthèse des protéines virales peut avoir lieu (Proud, 1995).

Une étude récente fait mention qu'une meilleure infectivité de réovirus se fait dans les cellules où Ras est activé via la voie Ras/RalGEF/p38 (Norman, 2004). Par ailleurs, lorsque le virus est injecté dans des tumeurs chez la souris où l'oncogène Ras est activé, une régression de la tumeur de 65 % à 80 % peut être observée (Coffey, 1998). De plus, il a été observé que le réovirus pouvait causer l'apoptose dans des lignées de cellules cancéreuses provenant de cancers du sein, du poumon et du col de l'utérus (Clarke, 2001). Bien que les cancers du sein ne soient causés que rarement par une mutation dans le proto-oncogène Ras, la voie de signalisation Ras est activé en amont dans ces types de cancers (Yang, 2004). Une étude démontre que dans des modèles murins du cancer du sein, le réovirus peut faire régresser la taille d'une tumeur et ce même si le virus est injecté dans un site éloigné de la tumeur (Norman, 2002). Ceci indique la possibilité d'utiliser le réovirus pour cibler des tumeurs inaccessibles par chirurgie.

Il a été observé que le réovirus peut aussi cibler les métastases d'un cancer du sein qui se localisent au niveau du cerveau (Yang, 2004). D'autre part, une étude menée sur des cellules provenant de cancers du colon et des ovaires démontre des résultats similaires où le réovirus se réplique et lyse mieux ces cellules où l'activité de l'oncogène Ras est élevé alors que le virus ne peut infecter des cellules normales du colon ou des ovaires où l'activité de Ras est à un niveau basal (Hirasawa, 2002). Encore là, l'étude démontre la possibilité d'utiliser le réovirus dans le traitement de cancer inaccessible anatomiquement puisqu'on peut voir une régression tumorale dans des modèles animaux du cancer du colon et des ovaires lorsque le virus est injecté dans la tumeur aussi bien que lorsque le virus est injecté dans le système sanguin (Hirasawa, 2002). Puisque le réovirus semble bien se répliquer dans des cellules cancéreuses où la voie de signalisation cellulaire Ras est activée, des études ont été menées sur d'autres lignées cancéreuses possédant une activation de Ras. Ainsi, le réovirus est capable d'infecter efficacement des lignées de cancer pancréatique où une mutation dans Ras est souvent rencontrée (Etoh, 2003). Lors de cette étude, il a été démontré que le réovirus se réplique préférentiellement au niveau de la tumeur sans infecter les tissus environnants.

Puisque un grand pourcentage de la population humaine possède une immunité face à réovirus, une étude de l'activité anti-tumorale de réovirus a été menée chez des souris immunocompétentes présentant ou non une immunité envers le virus. Il a été observé lors de cette étude que lorsque les souris sont traitées de façon simultanée avec le réovirus ainsi qu'avec des composés immunosuppresseurs, les souris qui ont des

tumeurs survivent mieux que ces mêmes souris traitées seulement avec le réovirus (Hirasawa, 2003). Une autre étude démontre la possibilité d'utiliser le réovirus dans le traitement du cancer de la vessie (Kilani, 2003). L'utilisation de réovirus dans le traitement des cancers lymphoïdes a été explorée lors d'études *in vitro* et *in vivo* chez la souris. Le réovirus est capable de se répliquer et de lyser préférentiellement plusieurs lignées lymphoïdes cancéreuses tel que les lignées du lymphome de Burkitt Raji et CA46. Des résultats similaires ont été obtenus chez des souris ayant développé des cancers reliés à ces lignées cellulaires (Alain, 2002; Thirukkumaran, 2003).

1.2 Organisation structurale de réovirus

1.2.1 Les capsides interne et externes

La capside interne de réovirus forme un icosaèdre composé de 60 sous-unités triangulaires asymétriques résultant en une triangulation de type $T=1$. Cette capside interne est recouverte d'une deuxième capside protéique possédant une triangulation de type $T=13$ (Nibert, 2001).

1.2.2 Les trois formes de particules

Une particularité de réovirus est qu'il se présente sous trois formes de particules selon l'étape du cycle de réplication ou bien selon le type d'environnement où il se trouve (Figure 1). En premier lieu, on peut retrouver le virion qui est une particule

virale complète totalement infectieuse. Elle possède toutes les protéines structurales et est la forme relâchée à la fin d'un cycle de réplication (Nibert, 2001). Son diamètre est d'environ 850 Å. La deuxième forme de particule est la particule subvirale infectieuse ou en anglais *infectious* (ou *intermediate*) *subviral particle* (ISVP). Elle s'identifie comme étant un virion partiellement digéré où la protéine majeure de la capsid externe $\sigma 3$ est totalement digérée et où l'autre protéine majeure de la capsid externe, la protéine $\mu 1C$, est partiellement digérée en deux fragments, δ et ϕ . Ces deux derniers restent liés à la particule virale (Borsa, 1973; Joklik, 1972). Un des points importants à retenir à propos des ISVPs est que la protéine $\sigma 1$ se retrouve sous une conformation relâchée contrairement au virion où elle est plus compacte et localisée plus profondément dans la structure du virus. Finalement, le réovirus peut se trouver sous forme de *core* ou nucléoïde (Smith, 1969) qui est essentiellement composé des protéines de la capsid interne et donc ne possède aucune des protéines $\mu 1$, $\sigma 3$ et $\sigma 1$ (Figure 1). La formation des ISVPs et des *cores* se fait habituellement à l'intérieur des cellules ou au niveau de l'intestin lors d'une infection naturelle mais ces particules peuvent aussi être générées *in vitro* par digestion protéolytique à l'aide de la chymotrypsine (Joklik, 1972).

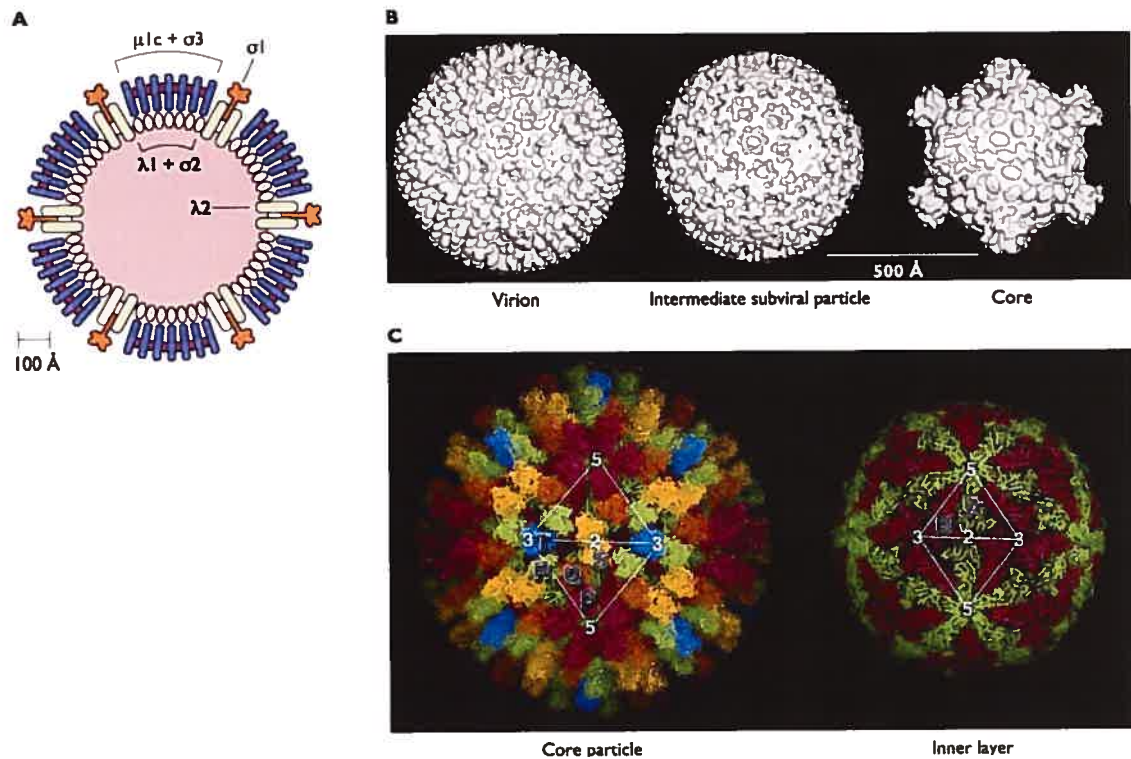


Figure 1. Les trois formes de particules de réovirus. (Tirée de : Flint, 2000)

Tableau I Propriétés des trois formes de particules virales.

<i>Particules</i>	<i>Propriétés</i>
Virion	Particule virale mature et infectieuse.
ISVP	Particule infectieuse, activité glycosidase; pénétration membranaire.
Core	Particule non infectieuse, transcriptionnellement active.

1.2.3 Organisation génomique de réovirus

Chez le réovirus, le génome est formé d'un total de dix segments d'ARNs bicaténaires classés selon leur taille en *large* (segments L1, L2 et L3), *medium* (segments M1, M2, M3) et *small* (segments S1, S2, S3 et S4) (Arnott, 1967; Bellamy, 1967; Gomatos, 1963; Shatkin, 1968). Bien que le génome de réovirus se retrouve segmenté une fois isolé des particules virales, il a été rapporté que ces segments seraient liés entre eux à l'intérieur du virion (Gomatos, 1964; Kavenoff, 1975). La plupart de ces segments sont monocistroniques et codent donc pour une seule protéine à l'exception des segments M3 et S1 qui codent quant à eux pour deux protéines (Ernst, 1985; Weiner, 1989). Dans le cas du segment M3, la séquence des gènes codant pour les deux protéines se retrouve sur le même cadre de lecture tandis que pour le segment S1, les séquences codantes se retrouvent sur deux cadres de lecture différents. Un fait important à mentionner est que chacun des segments ont à leur extrémité 5' et 3' des séquences non codantes qui semblent être impliquées dans la reconnaissance des molécules d'ARN virales par le virus lors de l'encapsidation (Roner, 2004). La longueur de ces séquences non codantes varie d'un segment à l'autre et d'une extrémité à l'autre sur un même segment allant de 12 à 32 nucléotides dans la région 5' et de 32 à 80 dans la région 3'. Par contre, tous les segments possèdent à leur extrémité 5' les nucléotides GCUA et à leur extrémité 3' les nucléotides UCAUC (Antczak, 1992). Une particularité dans la génétique de réovirus est la possibilité que des virus du même sérotype ou non puissent échanger des segments pour former des nouveaux réassortants de réovirus lors d'une infection (Wenske, 1985). Ces réassortiments peuvent avoir lieu

autant dans les cellules en culture que chez l'hôte animal. Ce phénomène est en partie responsable de l'évolution de réovirus. Il a été observé que, souvent, les réassortants contiennent une mutation dans leur segment S4 suggérant que cette caractéristique est nécessaire à la réalisation d'un tel phénomène (Joklik, 1995).

1.2.4 Organisation protéomique de réovirus

Comme mentionné ci haut, avec huit segments codant pour une protéine et deux segments codant pour deux protéines, le génome de réovirus code pour un total de 12 protéines. Ces protéines sont aussi classées selon leur taille en *large* (protéines λ_3 , λ_2 et λ_1), *medium* (protéines μ_2 , μ_1 , μ_{NS} et μ_{NSC}) et *small* (protéines σ_1 , σ_{1s} , σ_2 , σ_{NS} et σ_3). Parmi celles-ci, huit d'entre elles entrent dans la formation de la particule virale et sont donc qualifiées de protéines structurales. Dans la composition de la capsid interne se retrouve les protéines λ_1 , σ_2 , μ_2 , λ_3 et λ_2 , cette dernière faisant le pont entre la capsid interne et la capsid externe. Dans la capsid externe se retrouvent les protéines μ_1 , σ_3 et σ_1 (Nibert, 2001).

1.2.5 Fonctions et propriétés des protéines virales

Le réovirus étant un virus non enveloppé, les protéines de sa capsid externe vont souvent exercer plus d'une fonction contrairement aux virus enveloppés où les protéines à la surface du virus exercent habituellement une seule fonction (Flint, 2000). C'est ainsi qu'un virus enveloppé a plus de chance d'évoluer facilement qu'un

virus non enveloppé car il y a une pression plus forte chez ces derniers pour maintenir une intégrité dans la structure du virion et maintenir d'autre part les fonctions protéiques.

1.2.5.1 Protéines de la capsid externe

La protéine $\sigma 1$ de réovirus agit principalement comme antirécepteur viral (Lee, 1981) et posséderait aussi une activité glycosidase et mucinase (Bisaillon, 1999). Cette protéine de 49 kDa est présente sous forme de 12 trimères par particules et possède la propriété de lier l'acide sialique. Elle agit ainsi comme hémagglutinine virale (Weiner, 1978). Par ailleurs, la protéine $\sigma 1$ est responsable de la sérospécificité qui est observé par la formation, chez l'hôte infecté, d'anticorps neutralisant contre cette protéine (Weiner, 1977). Ainsi, la réponse immunitaire montée contre une infection à réovirus se fait spécifiquement contre la protéine $\sigma 1$ (Weiner, 1980; Sharpe, 1985). Cette protéine étant le sujet du présent travail, elle fera l'objet d'une description plus détaillée à la section 1.4. La protéine majeure de la capsid externe $\sigma 3$ serait responsable d'une part de la protection du virion permettant à celui-ci d'être plus résistant à la chaleur et à certains détergents (Nibert, 2001). Elle aurait aussi un rôle à jouer dans la régulation de la synthèse protéique (Imani, 1988) car cette protéine possède la propriété de lier l'ARNdb et d'inhiber l'activité kinase de la protéine PKR (Miller, 1992). La protéine $\sigma 3$, d'une masse moléculaire de 41 kDa, est présente au nombre de 600 par particules virales et se retrouve sous forme hétérotrimérique avec l'autre protéine majeure de la capsid externe $\mu 1$ (Shing, 1996). Cette dernière possède un rôle dans la pénétration de

la particule virale (**Lucia-Jandris**, 1993; **Odegard**, 2004) ainsi qu'une fonction dans l'activation de la transcription des ARNm viraux (**Drayna**, 1982). Elle possède une masse moléculaire de 76 kDa et est présente, tout comme la protéine σ_3 , au nombre de 600 par virion. La protéine μ_1 aurait aussi un rôle à jouer dans la régulation de la synthèse protéique car en se liant à la protéine σ_3 cette dernière ne peut plus exercer son activité de liaison à l'ARNdb (**Yue**, 1997).

1.2.5.2 Protéines de la capsid interne

Les protéines de la capsid interne ont des fonctions plus liées à la transcription et à la réplication du génome viral. La protéine λ_1 de 142 kDa est présente au nombre de 120 copies par virion. Elle possède comme activité principale une fonction hélicase et ARN triphosphatase (**Bisaillon**, 1997 (A); **Bisaillon**, 1997 (B)). La protéine λ_1 entre, avec la protéine σ_2 , dans la formation initiale de la capsid interne. La protéine σ_2 , ayant une masse moléculaire de 47 kDa, aurait probablement un rôle à jouer dans la réplication du génome (**Cross**, 1972). On retrouve 150 copies de cette protéine au sein d'une particule virale. La protéine λ_2 de 144 kDa, quant à elle, est bien connue pour former les projections typiques des cores donnant ainsi 12 tunnels pour permettre la sortie des ARNs et l'entrée des nucléotides. Chaque projection est formée d'un pentamère de λ_2 ce qui fait un nombre total de 60 copies par virion (**Coombs**, 1998). C'est une des protéines qui a le plus d'interaction avec les autres protéines virales faisant la jonction entre la capsid externe et la capsid interne (**Reinisch**, 2000). La protéine λ_2 a comme fonction d'ajouter la structure coiffe aux ARNm viraux et aurait

donc une activité guanylyl- et méthyltransferase (Cleveland, 1986). Seulement la forme pentamérique de la protéine possède de telles activités (Luongo, 2000). La protéine $\lambda 3$ agit en tant que ARN polymérase ARN dépendante (Starnes, 1993) et a donc pour fonction de transcrire et de répliquer le génome (Drayna, 1982). Elle a une masse moléculaire de 142 kDa et on en retrouve 12 molécules par particule (Cashdollar, 1994). La dernière protéine structurale, la protéine $\mu 2$, possède une masse moléculaire de 84 kDa et se retrouve au nombre de 120 par virion (Coombs, 1998). Cette protéine possède une activité de liaison à l'ARN (Brentano, 1998) et serait probablement un cofacteur ou une sous-unité de la polymérase du virus puisque des virus mutants thermosensibles pour cette protéine sont incapables de synthétiser de l'ARNdb aux températures non permissives (Yin, 1996).

1.2.5.3 Protéines non structurales

Bien que le réovirus transporte la plupart de ses protéines, il a recours à certaines protéines synthétisées au sein de la cellule lors d'une infection. La protéine σNS de 41 kDa a la propriété de lier les ARNsb et jouerait un rôle probable dans la sélection ou la réplication du génome viral (Antczak, 1992). Les protéines μNS et μNSC , toutes deux codées par le segment M3, possèdent elles aussi la capacité de lier les ARNm de réovirus et joueraient probablement un rôle aussi dans les étapes de la réplication du génome ou de la sélection des ARNs viraux lors de l'assemblage (Antczak, 1992). Finalement, bien que la fonction de la protéine $\sigma 1s$ ne soit pas clairement établie, il semblerait qu'elle joue un rôle dans l'inhibition de la synthèse de

l'ADN cellulaire et augmenterait, dans certains cas, les effets cytopathiques occasionnés par l'infection du réovirus (Fajardo, 1990). Une récente étude démontre son rôle joué dans l'arrêt du cycle cellulaire au stade G2/M lors d'une infection (Poggioli, 2000).

Tableau II Fonctions des protéines de réovirus.

Protéine	Segment	Nombre par virion	Fonction
$\lambda 1$	L3	120	ARN triphosphatase et ARN hélicase
$\lambda 2$	L2	60	Guanylyltransférase et méthyltransférase
$\lambda 3$	L1	12	ARN polymérase ARN-dépendante
μNSC	M3	0	Inconnue
μNS	M3	0	Reconnaissance et/ou encapsidation des ARNs
$\mu 1$	M2	600	Pénétration du virion dans la cellule
$\mu 2$	M1	20	NTPase
$\sigma 1$	S1	36	Antirécepteur, hémagglutinine et glycosyl hydrolase
$\sigma 1s$	S1	0	Rôle dans le blocage G2/M
$\sigma 2$	S2	150	Liaison à l'ARN db
σNS	S3	0	Reconnaissance et/ou encapsidation des ARNs
$\sigma 3$	S4	600	Protection du virion, liaison à l'ARN db et rôle lors de traduction, inhibition de PKR

1.3 Cycle de réplication

1.3.1 Attachement

Au début de l'infection au niveau du système digestif, il a été rapporté que le virus va se lier aux cellules M et emprunter le transport transépithélial de ces cellules pour accéder la muqueuse intestinale (Figure 2). Le premier événement dans le cycle de vie de réovirus est, comme pour tous les virus de mammifères, l'attachement à la cellule hôte via le récepteur cellulaire, en l'occurrence la *junctional adhesion molecule 1* (JAM1) ou l'acide sialique (Barton, 2001; Forrest, 2003). Lors d'études *in vitro*, l'attachement maximal mesuré est atteint après 30 à 90 minutes et ce, peu importe la température (Armstrong, 1984; Epstein, 1984; Gentsch, 1984).

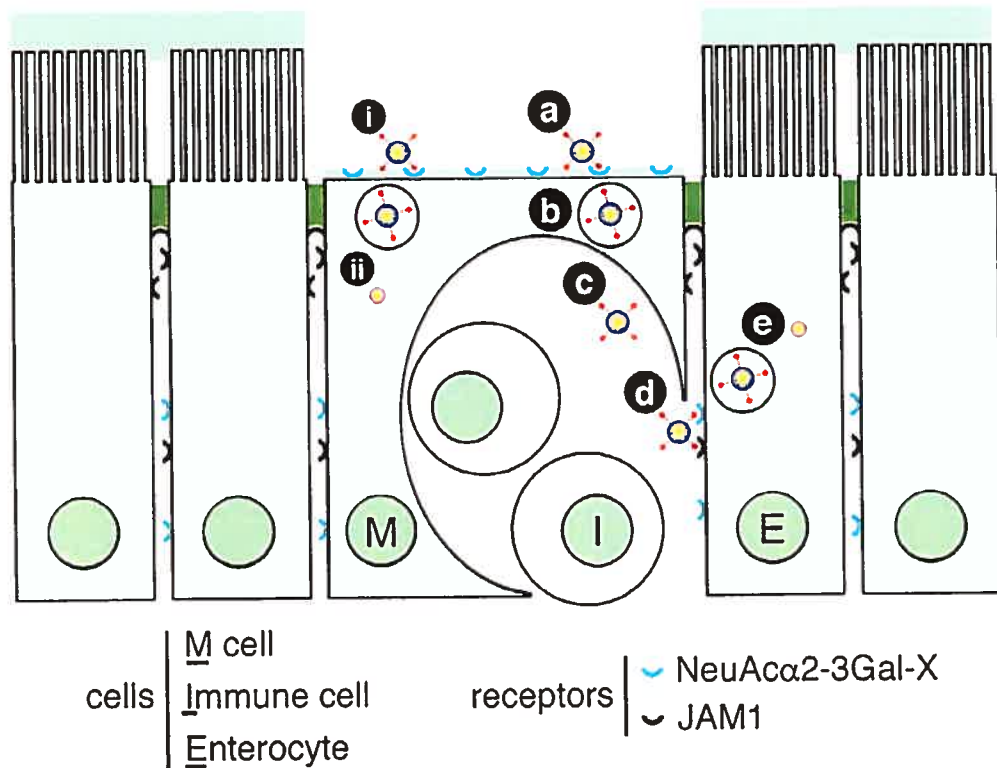


Figure 2. Utilisation du transport transépithéliale des cellules M lors d'une infection par réovirus (Helander, 2003).

1.3.2 Pénétration

Une fois qu'il y a adsorption du virus sur le récepteur cellulaire, il y a endocytose de la particule virale qui se retrouve à ce moment dans des vésicules recouvertes de clathrine (**Borsa**, 1979; **Rubin**, 1992; **Sturzenbecker**, 1987) pour ensuite se retrouver, par translocation au long de microtubules, dans des endosomes et lysosomes (**Georgi**, 1990). Il a été possible récemment de visualiser ce phénomène en temps réel avec des virus fluorescents (**Ehrlich**, 2004). Un temps d'environ 400 secondes a été mesuré dans la formation de cette vésicule de clathrine autour du virus et

une fois le virus à l'intérieur de la cellule, il se déplace à une vitesse de 26 nm/s vers les compartiments cellulaires. Lorsque le réovirus se retrouve dans les compartiments endo-lysosomiaux, il est possible d'observer une protéolyse des protéines de la capsid externe seulement 20 à 30 minutes après infection (**Sturzenbecker**, 1987). C'est dans ces compartiments que la formation des ISVPs a lieu par dégradation de la protéine $\sigma 3$ et digestion partielle de la protéine $\mu 1C$ pour former les fragments δ et ϕ (**Nibert**, 1992; **Silverstein**, 1972). Cette digestion se fait à pH acide par l'intermédiaire de protéases acides, telles que la cathepsine (**Baer**, 1999), car en présence de base faible telle que le chlorure d'ammonium (NH_4Cl) prévenant l'acidification des endosomes il n'y a pas conversion d'ISVP à partir de réovirus (**Canning**, 1983). Les ISVPs sont aussi formés lors de l'infection naturelle au niveau de l'intestin par des enzymes protéolytiques comme les sérine protéases pancréatiques (**Bass**, 1990; **Bodkin**, 1989). La formation de ces ISVPs au niveau de l'intestin est nécessaire pour initier un cycle de réplication chez l'animal (**Amerongen**, 1994; **Bass**, 1990). Une fois les ISVPs formés, ces particules peuvent interagir avec la membrane endo-lysosomale et pénétrer à l'intérieur du cytoplasme de la cellule infectée. Cette caractéristique unique des ISVPs est une propriété de la protéine $\mu 1$ (**Hooper**, 1996; **Lucia-Jandris**, 1993). Les ISVPs formés à l'extérieur de la cellule peuvent directement interagir et pénétrer à partir de la membrane plasmique de la cellule. En présence de NH_4Cl , seulement les ISVPs peuvent effectuer un cycle de réplication complet puisqu'ils n'ont pas besoin d'emprunter la voie des endosomes (**Sturzenbecker**, 1987; **Lucia-Jandris**, 1993). Les caractéristiques probables qui permettent à la protéine $\mu 1$ d'interagir avec les membranes plasmiques sont la présence d'un groupe myristyl dans la partie N-terminal

permettant à la protéine de s'ancrer dans la membrane ainsi que la présence d'hélices alpha amphipatiques à la jonction ϕ - δ (Nibert, 1992; Nibert, 1991). Une récente étude démontre l'importance du clivage de la protéine $\mu 1$ pour former le fragment myristylé $\mu 1N$ et le fragment $\mu 1C$ dans la pénétration du virus puisque des virus possédant une mutation au site de clivage de la protéine à la position 42 ont une diminution importante d'infectivité et perdent la capacité d'hémolyser les érythrocytes (Odegard, 2004). La protéine $\mu 1$ agirait soit en altérant l'intégrité de la membrane plasmique permettant au virus de la franchir ou bien en formant des pores au niveau de la membrane (Borsa, 1979; Nibert, 1992; Tosteson, 1993). Le fragment $\mu 1N$ initierait probablement ce phénomène en quittant les particules virales pour aller s'insérer dans la membrane plasmique (Odegard, 2004; Nibert, 2005). De plus, il a été rapporté qu'au cours de la pénétration des membranes plasmiques par les ISVPs, il y a un changement important de conformation de la protéine $\mu 1$ ainsi qu'une perte de la protéine $\sigma 1$ (Chandran, 2003). Ce type de particule, qu'on nomme ISVP*, est un intermédiaire entre les ISVPs et les *cores* et devient au cours du changement conformationnel graduellement plus transcriptionnellement actif (Chandran, 2002).

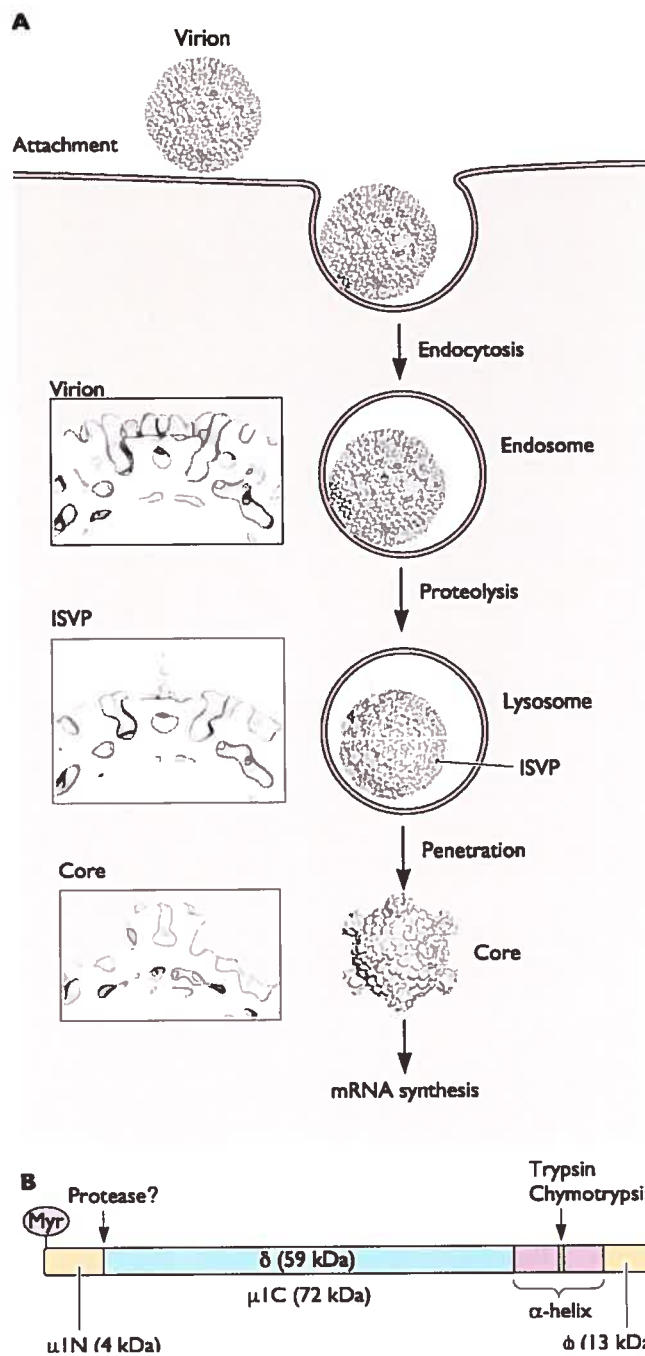


Figure 3. Initiation de l'infection du réovirus (Flint, 2000).

1.3.3 Transcription du génome

Arrivé au cytoplasme, le changement conformationnel de la particule continue pour former ensuite des cores (Figure 2). Cette forme de particule est la forme qui est transcriptionnellement active et cette activité coïncide avec la perte de la protéine $\mu 1$ (Borsa, 1974; Drayna, 1982; Shatkin, 1968). C'est ainsi que les cores vont générer des ARNm correspondant à chacun des dix segments (Banerjee, 1970; Bartlett, 1974; McCrae, 1981). Ces ARNm sont coiffés à leur extrémité 5' (Furuichi, 1975). La perte de la protéine $\mu 1$ occasionne des changements structuraux au niveau de la particule et ces changements sont requis pour une bonne transcription des ARNm (Powell, 1984). Plus précisément, lorsque la protéine $\mu 1$ est digérée, les pentamères de protéines $\lambda 2$ changent de conformation pour s'ouvrir et laisser entrer les nucléotides et sortir les ARNm (Dryden, 1993). Les ARN messagers primaires peuvent être détectés après deux heures d'infection et atteignent un maximum à huit heures post-infection (Zweerink, 1970) avec une production de protéines virales atteignant un maximum après dix heures d'infection (Gomatos, 1963). Ces ARNs servent non seulement comme ARNm mais aussi comme brin négatif dans la formation des dix segments d'ARN bicaténaire (Silverstein, 1970). La transcription des autres segments semble nécessiter une synthèse protéique préalable après cette première phase de transcription (Lau, 1975; Shatkin, 1972). Ces transcrits secondaires proviennent de particules assemblées à partir d'ARN et de protéines virales fraîchement synthétisés (Ito, 1972). La protéine qui est responsable de la transcription et aussi de la réplication du génome est la protéine $\lambda 3$ (Starnes, 1993) avec l'aide de la protéine $\lambda 1$ qui agit à titre

d'hélicase et d'ARN triphosphatase (**Bisaillon**, 1997 (A); **Bisaillon**, 1997 (B); **Noble**, 1997). La protéine $\lambda 2$ a pour fonction de coiffer les transcrits et agit ainsi à titre de guanylyl- et méthyltransférase (**Luongo**, 1998). Lors d'une infection, les dix transcrits sont produit à un niveau inversement proportionnel à leur taille (**Zweerink**, 1970).

1.3.4 Réplication du génome et assemblage

Lors de la formation de nouvelles particules, une copie de chacun des ARNm correspondant aux dix segments sont encapsidés et la synthèse du brin complémentaire se fait au niveau de la nouvelle particule virale (**Ward**, 1972; **Zweerink**, 1972; **Zweerink**, 1974). La sélection et l'encapsidation des dix segments d'ARN n'est pas très bien connu, mais il semblerait que les séquences non codantes aux extrémité 5' et 3' de ces segments joueraient un rôle dans ce phénomène (**Furuichi**, 1975; **Roner**, 2004). La protéine σ_{NS} pourrait jouer aussi un rôle lors de la sélection des ARNm car elle possède la propriété de se lier de façon sélective à des endroits bien précis sur les ARNs monocaténares (**Huismans**, 1976). Il semblerait aussi que les protéines μ_{NS} et σ_3 , tout comme la protéine σ_{NS} , formerait des complexes nucléoprotéiques ce qui suggère un rôle dans l'assemblage des ARNs viraux (**Antczak**, 1992). Ces complexes forment les premières particules virales en formation. Une fois que les brins positifs sont encapsidés, ces ARNs servent de matrice pour la synthèse du brin complémentaire pour la formation des dix segments d'ARN bicaténaire (**Acs**, 1971). Cette synthèse se déroule dans des particules qui sont formées des capsides internes et externes et ne contiennent aucunes protéines non structurales. Une fois que la synthèse du brin négatif

est terminée, ces particules deviennent résistantes à l'action des ARNases (**Morgan**, 1975). L'ordre dans lequel l'assemblage des protéines s'effectue n'est pas très bien connu. Par contre, il a été rapporté que dans des cellules co-exprimant les protéines $\lambda 1$ et $\sigma 2$, on peut voir la formation de particules virales morphologiquement similaire à des *cores*. Lorsque les protéines $\lambda 2$ et $\lambda 3$ sont co-exprimées avec les deux premières, elles sont aussi incorporées dans ces particules virales et la formation des tunnels de $\lambda 2$ peut être détectée (**Xu**, 1993). Il a aussi été rapporté lors d'étude de recapsidation que les protéines majeures de la capsid externe $\mu 1$ et $\sigma 3$ forment un complexe hexamérique et peuvent s'assembler sur des *cores* pour former des particules virales complètes lorsque la protéine $\sigma 1$ est aussi ajoutée (**Chandran**, 2001).

1.3.5 Relâche

Une fois les particules virales complétées, la mort cellulaire par nécrose associé à une déstabilisation de la membrane plasmique peut survenir et le virus peut s'échapper à ce moment des cellules lysées (**Nibert**, 2001). Par ailleurs, le réovirus de sérotype 3 peut aussi lyser les cellules de façon spécifique par apoptose (**Tyler**, 1995).

1.4 La protéine $\sigma 1$

1.4.1 Structure de la protéine $\sigma 1$

La protéine $\sigma 1$ est une protéine multimérique composée de trois monomères identiques ayant un poids moléculaire de 49 kDa chacun (**Strong**, 1991). Il a été démontré, par microscopie électronique, que la protéine $\sigma 1$ a l'allure d'une longue queue fibreuse avec une tête globulaire à une de ses extrémités (Figure 4). Un fragment de la protéine $\sigma 1$ allant des acides aminés 246 à 455 a été cristallisé donnant un fragment d'une longueur de 120 Å et d'une largeur de 50 Å quoique la protéine entière a été mesurée à 480 Å (**Fraser**, 1990). Lorsque cette structure est comparée avec celle de la protéine *Fiber* de l'adénovirus (Figure 5), il semble y avoir un lien évolutif entre ces deux protéines, quoiqu'une pression biologique ait pu mener à ces deux structures de façon indépendante puisqu'ils lient tous deux des récepteurs hautement similaires de la famille des immunoglobulines (**Prota**, 2003).

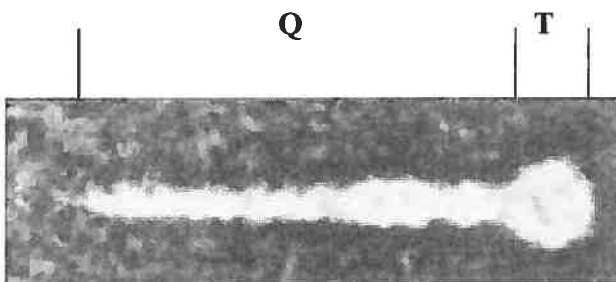


Figure 4. Microscopie électronique de la protéine $\sigma 1$ de réovirus. Q : Queue, T :

Tête (adaptée de : Fraser, 1990).

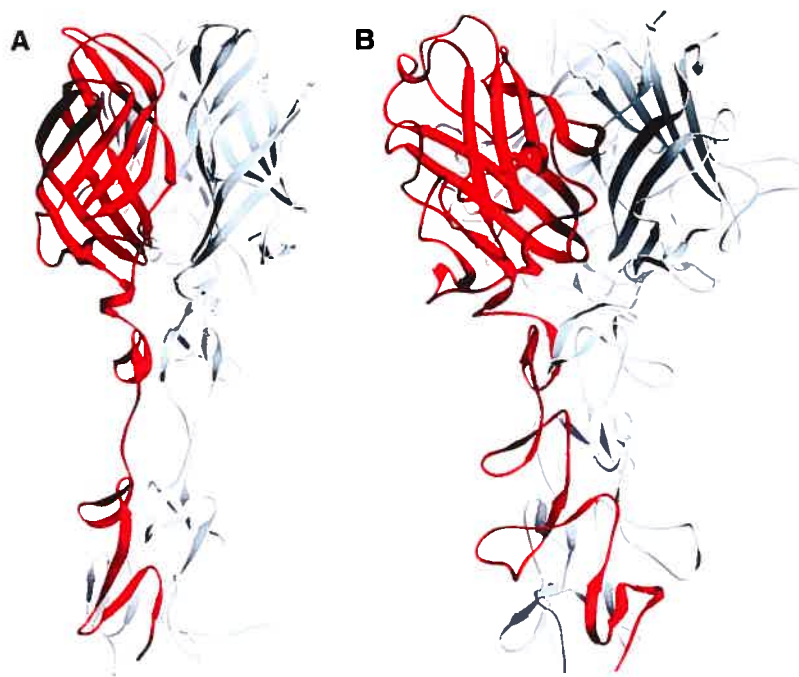


Figure 5. Comparaison de la structure de la protéine $\sigma 1$ (A) de réovirus et de la protéine *fiber* (B) de l'adénovirus (Chappell, 2002).

1.4.2 Formation du trimère

La protéine $\sigma 1$ contient deux domaines nécessaires à la formation du trimère. La trimérisation de la partie N-terminale de la protéine précède celle de la partie C-terminale et est nécessaire pour générer la tête trimérique globulaire. Par contre, la tête une fois formée n'a pas besoin de la partie N-terminale pour garder sa structure et son activité biologique (Leone, 1992). Il a été démontré que la trimérisation de la partie N-terminale, en l'occurrence la queue fibreuse, est effectuée de façon cotraductionnelle (Leone, 1996). Cette étape ne requiert pas l'assistance de chaperonnes, tel que Hsp70,

ni d'ATP. Par contre, la formation du trimère dans la partie C-terminale, pour former la tête globulaire, nécessite la participation des chaperonnes Hsp70 et Hsp90 ainsi que de l'ATP (Gilmore, 1998). La trimérisation de la queue forme ce qu'on appelle une triple spirale β (Chappell, 2002). Ce type de spirale est caractérisé par des séquences répétées d'acides aminés hydrophobes riches en glycine et proline (van Raaij, 1999).

1.4.3 Liaison à la cellule

Il été mentionné plus haut que la protéine $\sigma 1$ agit à titre d'antirécepteur viral (Joklik, 1981). Cette activité est possible grâce à la présence de deux domaines permettant à la protéine de se lier à ses récepteurs. Le premier domaine se situe dans la tête globulaire et permet au virus de se lier sur son récepteur principal qui est la *Junction Adhesion Molecule 1* (JAM1) (Baron, 2001). Cette molécule de 40 kDa fait partie de la famille des immunoglobulines et est impliquée dans la formation des jonctions serrées ainsi que dans la migration transendothéliale des leucocytes (Del Maschio, 1999; Liu, 2000; Martin-Padura, 1998; Mandell, 2004; Ostermann, 2002; Williams, 1999). Puisque la liaison à JAM1 est conservée chez tous les sérotypes de réovirus, des études de similarité de séquence en acides aminés a révélé une région hydrophobe conservée dans la tête globulaire allant des résidus 369 à 384 (Chappell, 2002) qui serait probablement responsable de la liaison au récepteur (Figure 6).



Figure 6. Domaine (en rouge) impliqué dans la liaison à JAM1 (adapté de :Chappell, 2002).

Lorsque l'antirécepteur se lie à son récepteur cellulaire, des changements de conformation peuvent être mesurés sur $\sigma 1$ ainsi que sur les autres protéines de la capsid. Ces changements de conformations de $\sigma 1$, occasionnant des restructurations au sein de la particule virale, peuvent servir à titre d'information de la liaison cellulaire et permettre au virus de bien se positionner pour continuer son cycle infectieux (**Fernandes**, 1994). Le deuxième domaine de liaison se situe dans la queue fibreuse et permet au virus de se lier à l'acide sialique (Figure 7). Grâce à cette propriété, cette protéine possède aussi une activité hémagglutinine (**Weiner**, 1978; **Yeung**, 1987) qui permet au réovirus d'agglutiner les globules rouges en se liant à la glycophorine présente sur les érythrocytes humains (**Paul**, 1987).

Des études avec des protéines chimériques de $\sigma 1$ ont démontré la présence d'une région riche en feuillets β dans la queue fibreuse de cette protéine qui permet au réovirus de sérotype 3 de lier l'acide sialique. Ce deuxième domaine se retrouve uniquement dans la protéine $\sigma 1$ du sérotype 3 puisque c'est le seul qui est capable d'utiliser l'acide sialique comme récepteur. De plus, une étude a démontré que la liaison du réovirus T3D sur les cellules peut être inhibé par la présence de mucines solubles riches en acides sialiques alors que le réovirus T1L peut suivre son infection sans problème (**Pacitti, 1987**). Quelques acides aminés dans cette région responsable pour la liaison à l'acide sialique ont été identifiés lors d'études d'hémagglutination. D'autres clones viraux n'ont pas la capacité d'hémagglutiner les érythrocytes. Cette incapacité est causée chez le clone T3C43 par la présence d'une aspartate en position 198, chez le clone T3C44 par la présence d'une leucine en position 204 et chez le clone T3C84 par la présence d'un tryptophane en position 202 (**Dermody, 1990**). Bien que la protéine $\sigma 1$ du réovirus T1L ne peut lier l'acide sialique, il existe, dans la partie C-terminale de la queue riche en feuillets β , un domaine qui permet à cette dernière de lier d'autres types de glycoprotéines (**Chappell, 2000**). Cette différence dans la capacité de lier différentes glycoprotéines entre les sérotypes de réovirus est observable par le fait que les souches de réovirus T1L et T3D ont la capacité de lier des érythrocytes humains de type O alors que seuls les réovirus de sérotype 3 peuvent lier des érythrocytes bovins, riches en glycophorine A (**Dermody, 1990**). Des études de cinétiques de liaison ont démontrées que la liaison du réovirus sur la cellule se fait initialement via l'acide sialique par des interactions de faible affinité; ces interactions

permettent ensuite au virus de se lier à JAM1 par une liaison de forte affinité (Barton, 2001).

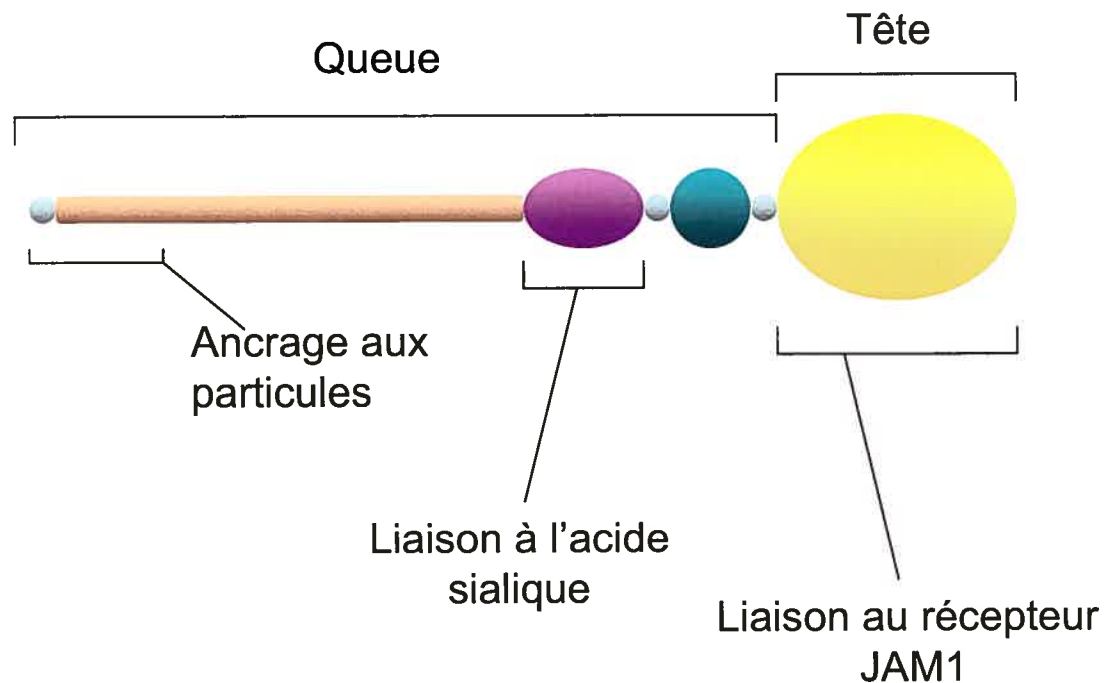


Figure 7. Localisation des domaines importants pour la liaison cellulaire et l'ancrage aux particules virales (adaptée de : Nibert, 2001).

1.4.4 Ancrage de $\sigma 1$ dans le virion

Pour pouvoir s'ancrer dans la particule virale, la protéine $\sigma 1$ possède dans sa partie N-terminale des acides aminés hydrophobes. Les acides aminés 3 à 34 vont ainsi interagir avec les pentamères de $\lambda 2$ pour ancrer les trimères de $\sigma 1$ au sein du virion

(Leone, 1991). Bien qu'il y ait normalement 12 trimères par virion, un minimum de trois trimères est nécessaire pour que la particule virale soit infectieuse (Larson, 1994).

1.4.5 Régions flexibles au sein de $\sigma 1$

La protéine $\sigma 1$ possède une région flexible qui permet à la tête de se mouvoir pour exercer sa fonction d'antirécepteur. Elle est située à proximité de la tête globulaire et est sensible aux protéases chez certaines souches de réovirus de sérotype 3. Les enzymes protéolytiques peuvent effectuer un clivage entre l'arginine en position 245 et l'isoleucine en position 246. La thréonine en position 249 jouerait un rôle dans la susceptibilité de la protéine $\sigma 1$ dans cette digestion protéolytique. La thréonine agirait en stabilisant les liaisons entre les hélices α situées dans cette région par des interactions hydrophobes permettant ainsi de rendre accessible l'arginine 245 aux protéases (Chappell, 1998). Il existerait une autre région flexible au milieu de la queue fibreuse quoi que cette région précise n'a pas encore été découverte (Fraser, 1990). La progression de la spirale formant la queue est interrompue par les acides aminés 291 à 294 et ces derniers causeraient une certaine flexibilité à proximité de la tête (Chappell, 2002).

1.4.6 Rôle de $\sigma 1$ dans la pathogénèse

Dans plusieurs études, le caractère pathogène du réovirus a été attribué à la protéine $\sigma 1$. Il a été observé que le réovirus T3A ainsi qu'un clone du sérotype 3,

T3C31, sont responsable de l'obstruction des voies biliaires chez les souris nouveau-nés. Cette étude ainsi que des études de réassortiment ont révélé que le gène S1 du réovirus T3A était fortement associé à la capacité du réovirus de causer ces obstructions à l'origine de maladies hépatobiliaires. Des souris infectées avec un monoréassortant contenant tous les gènes du type T3A à l'exception du gène S1 n'ont pas développé d'atrésie biliaire (**Wilson**, 1994). Récemment, une étude d'infectivité et de pathogenèse avec des souches de sérotype 3 isogéniques qui diffèrent seulement par leur capacité de lier l'acide sialique (T3SA+ et T3SA-) a été menée chez la souris. Cette différence dans la liaison à l'acide sialique est occasionnée par une substitution d'une proline par une leucine en position 204 de la protéine $\sigma 1$ (**Barton**, 2001). Il a été observé que les souches liant l'acide sialique étaient plus propices à causer des lésions propres à l'atrésie biliaire. En effet, chez les souris infectées avec du réovirus T3SA+, le virus se répandait plus rapidement de l'intestin au foie et au cerveau et se répliquait à un titre plus élevé dans cet organe. Beaucoup d'inflammation a été observée au niveau du foie ainsi que dans les conduits biliaires intra hépatiques. Il a été suggéré que la capacité de certains virus à lier les glycoprotéines pouvait influencer le développement d'une pathologie (**Barton**, 2003).

Par ailleurs, quelques variants du réovirus de type 3 Dearing possédant une mutation dans l'hémagglutinine démontrent une pathogenèse atténuée (**Bassel-Duby**, 1986; **Spriggs**, 1982; **Spriggs**, 1983). Deux anticorps monoclonaux, A2 et G5, spécifiques à la protéine $\sigma 1$ n'ont pas la capacité de se lier à l'hémagglutinine de certains de ces variants ce qui indiquerait un changement de conformation de la

protéine $\sigma 1$ dû à la présence des mutations (**Bassel-Duby, 1986**). Pour les variants F et K, l'acide glutamique en position 419 de la protéine est remplacé par une lysine tandis que pour le variant A14 il est remplacé par une alanine et pour le variant A17 par une glycine. Cette mutation se situe à l'interface des trois têtes globulaires du trimère de $\sigma 1$ ce qui pourrait résulter en une déstabilisation de la structure de la protéine (**Chappell, 2002**). Le variant A, quant à lui, possède aussi une mutation dans la jonction des trois monomères de $\sigma 1$ mais à la position 340 de la protéine. Les variants A14 et A17 sont environ 100 000 fois moins virulents que la souche sauvage du réovirus T3D (**Bassel-Duby, 1986**). De plus, des études de réassortiment ont démontré que la différence entre le réovirus de sérotype 1 et de sérotype 3 dans la voie empruntée pour se rendre au système nerveux central, et de ce fait de causer des pathologies différentes, peut être attribuée au segment S1 (**Tyler, 1986**).

1.4.7 La protéine $\sigma 1$ et l'apoptose

Le caractère pathogène de réovirus est, entre autres, attribué à sa capacité pro-apoptotique. Les réovirus T3A et T3D induisent l'apoptose *in vitro* et *in vivo* plus souvent et de façon plus efficace que le réovirus T1L (**Tyler, 1995**). Cette différence dans la propriété d'induire l'apoptose entre ces virus est déterminée par les segments S1 et M2 (**Clarke, 2001**). En utilisant des souches isogéniques de réovirus qui diffèrent seulement par leur capacité de lier l'acide sialique, il a été démontré que les souches du réovirus T3A liant l'acide sialique induisent l'apoptose beaucoup plus que les réovirus T3A ne s'y liant pas. Les cellules dépourvues d'acide sialique à leur surface ne

subissent pas l'apoptose lors d'une infection par réovirus (**Connolly**, 2001). Par contre, les réovirus T3SA+ ne peuvent induire l'apoptose en absence de liaison à JAM1 (**Barton**, 2001). Les mécanismes d'induction de l'apoptose par le réovirus ont été relativement peu explorés jusqu'à ce jour mais impliqueraient l'activation de NF- κ B (**Connolly**, 2000), de la calpaïne et des *death receptors* DR4 et DR5 ainsi que de leur ligand, TRAIL (**Clarke**, 2000).

1.4.8 Activité mucinolytique

Une analyse de séquence en acides aminés de la protéine σ 1 a démontré qu'il existe, dans sa partie N-terminale, une similarité de séquence avec les lysozymes de type-C (*chicken-type lysozymes*). La similarité de séquence a révélé la présence, chez σ 1, de deux acides aminés connus pour avoir une fonction biologique reliée à l'activité des lysozymes de type-C soit le glutamate (E) en position 36 et l'aspartate (D) en position 54 (**Bisaillon**, 1999). Ainsi, tout comme chez les lysozymes de type-C, le glutamate participerait à l'hydrolyse des chaînes de polysaccharides en donnant un proton à l'oxygène qui forme le lien glycoside entre l'acide acétylmuramique et l'acétylglucosamine. L'aspartate jouerait un rôle dans la stabilisation du complexe (**Matsumura**, 1996). Lorsque ces acides aminés ont été remplacés par leur acide aminé équivalent non chargé dans des protéines σ 1 recombinantes, une perte totale de l'activité enzymatique a été observée pour les substitutions d'acide aminé E36Q et E36D, et une perte de près de 95% de l'affinité pour le substrat avec la substitution d'acide aminé D54N (**Bisaillon**, 1999). Ces données sont identiques avec celles

obtenues lors d'études de mutagenèse dirigée menées avec les lysozymes de type-C (**Matsumura**, 1996). Une fonction biologique probable de cette activité dans la dégradation de la mucine a été proposée pour la protéine $\sigma 1$ (**Bisailon**, 1999). En effet, la mucine forme en grande partie le mucus qui recouvre l'épithélium intestinal et sa structure est très similaire à celle du substrat naturel des lysozymes de type-C soit les polysaccharides bactériens (**Mantle**, 1989). Une étude pour explorer l'activité mucinolytique de $\sigma 1$ a donc été menée avec de la mucine dans un essai *in vitro* ainsi que dans un système cellulaire exprimant la mucine de type 1. Cette étude a révélé que la forme mature du réovirus, en l'occurrence le virion, est incapable de dégrader la portion glycoside de la mucine alors que l'ISVP en est capable. De plus, l'infectivité des virions est réduite d'environ dix fois chez des cellules qui expriment la mucine alors que les ISVPs gardent la même infectivité qu'en absence de mucine (**Bisailon**, 1999). Ce résultat concorde avec le fait que le site catalytique, formé des acides aminés E36 et D54, se retrouve dans la partie N-terminale de $\sigma 1$ et que c'est seulement dans l'ISVP que cette région est démasquée, car $\sigma 1$ se retrouve à ce moment sous une forme relâchée (**Nibert**, 2001). De plus, ce résultat est en accord avec les observations au niveau de l'intestin chez la souris, où la forme ISVP est nécessaire pour une meilleure infectivité du virus (**Amerongen**, 1994). Cette meilleure infectivité serait expliquée par l'activité mucinolytique de $\sigma 1$ présente dans les ISVPs (Figure 8).

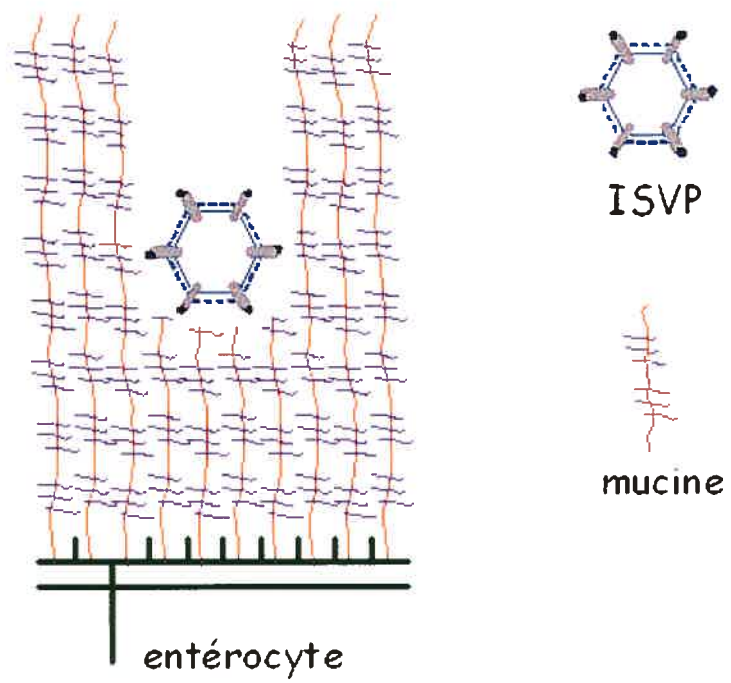


Figure 8. Activité mucinolytique du réovirus.

2. Objectifs du projet

Il a été démontré que la protéine $\sigma 1$ de réovirus de sérotype 3 Dearing possède une activité mucinolytique *in vitro*. Cette activité n'est présente que chez les ISVPs où la protéine $\sigma 1$ se retrouve sous une forme relâchée démasquant ainsi son site actif. Grâce aux études de mutagenèse dirigée au niveau du site catalytique, il a été possible d'identifier la paire d'acides aminés responsables de la dégradation de la partie glycoside de la mucine.

Le but de mon projet consistait à étudier l'effet de la substitution d'acides aminés au niveau du site actif de la protéine $\sigma 1$ dans une particule virale entière, afin de démontrer que l'activité mucinolytique est véritablement impliquée dans l'infectivité du réovirus en présence de mucine. Bien qu'une technique assez complexe de génétique inverse ait été mise au point pour effectuer des études sur le réovirus (**Roner**, 2001; **Roner**, 2004), nous nous sommes plutôt tourné vers une technique mieux établie de recapsidation *in vitro* (**Jane-Valbuena**, 1999; **Chandran**, 1999; **Chandran**, 2001) pour explorer cette question. Le seul désavantage de la méthode de recapsidation repose sur le fait qu'un seul cycle de réplication peut être étudié puisque les mutations ne sont pas intégrées au sein du génome viral.

Dans un premier temps, les protéines de la capsid externe $\mu 1$ et $\sigma 3$, ainsi que la protéine $\sigma 1$ sauvage ou portant diverses substitutions d'acides aminés au niveau du site catalytique, devaient être produites à l'aide du système d'expression à baculovirus afin

d'obtenir des quantités adéquates de protéines fonctionnelles. Dans un deuxième temps, l'efficacité de recapsidation des particules virales avec les protéines recombinantes ainsi que l'infectivité de ces dernières sur des cellules fibroblastiques contrôles L929 devaient être déterminées. Finalement, l'infectivité des particules recapsidées avec la protéine $\sigma 1$ contenant ou non une substitution d'acide aminé au niveau du site actif devait être mesuré sur des cellules épithéliales MDCK et des cellules MDCK exprimant la mucine transmembranaire de type 1 à leur surface.

Une meilleure connaissance de l'infection au niveau de la muqueuse intestinale et plus particulièrement de l'activité mucinolytique du réovirus permettra de mieux comprendre la biologie et la pathogenèse du réovirus et d'autres virus d'intérêt médical apparentés au réovirus, tel que le rotavirus qui est une des causes principales de mortalité infantile dans les pays en voie de développement. De plus, la compréhension de l'activité mucinolytique du réovirus pourrait permettre de cibler et de sélectionner des virus ayant une meilleure infectivité dans les cellules cancéreuses d'origine épithéliale où l'expression de la mucine est souvent augmentée.

3. Matériel et Méthodes

3.1 Matériel

Le chlorure de césium a été acheté chez ICN Biomedicals, Inc (Californie, États-Unis). Les milieux de culture pour les cellules de mammifère ont été obtenus chez Wisent Inc. (Saint-Bruno, Québec, Canada). Les milieux de culture pour les cellules d'insecte proviennent de chez Gibco Life Technologies (Burlington, Ontario, Canada). Le sérum de veau, la pénicilline/streptomycine, la glutamine, l'amphotéricine B, ainsi que les acides aminés non essentiels utilisés en culture cellulaire ont été achetés chez Wisent Inc. L'anticorps polyclonal hétérosécific anti-réovirus de type 3 utilisé lors des techniques d'immunobuvardage provient de la compagnie Cedarlane (Hornby, Ontario). L'anticorps monoclonal anti- $\sigma 1$ de type 3 utilisé lors des techniques d'immunoprécipitation provient de Chemicon International (Californie, États-Unis). L'anticorps secondaire de chèvre dirigé contre les immunoglobulines de lapin et couplé à la peroxydase, utilisé lors des techniques d'immunobuvardage, a été acheté de la compagnie Pierce (Brockville, Ontario). L'agarose couplé à la protéine G, utilisée lors des techniques d'immunoprécipitation, provient de chez Roche Boehringer Mannheim. Les membranes utilisées lors des transferts de protéines sont des membranes de nitrocellulose Protran[®] provenant de chez Schleicher & Schuell BioScience (Guelph, Ontario). Le Bis/Acrylamide et le Temed pour la confection des gels de protéines ont été obtenus chez Biorad (Mississauga, Ontario). Les films Biomax XAR de Kodak proviennent de chez Amersham (Baie d'Urfé, Québec). Le mélange

méthionine/cystéine radiomarqué au ^{35}S provient de chez Perkin Elmer Life Science (Ontario, Canada). Le système d'expression protéique *Bac-to-Bac*[®] *Baculovirus Expression System* a été obtenu de Gibco Life Technologies.

3.2 Méthodes

3.2.1 Culture cellulaire

Les fibroblastes murins L929 en provenance de l'ATCC à un passage de 569 ont été cultivés dans du milieu MEM contenant 10% de sérum de veau fœtal, 1% de pénicilline/streptomycine et 1% de glutamine. Les cellules épithéliales canines *Madin Darby Canine Kidney* (MDCK) exprimant ou non la mucine de type 1 ont été cultivées dans un milieu contenant 50% de Ham-F12, 50% de DMEM, 3% de sérum de veau fœtal, 1% de pénicilline/streptomycine et 1% de glutamine. Les cellules épithéliales Caco-2 ont été cultivées dans du milieu DMEM contenant 15% de sérum de veau fœtal, 1% de pénicilline/streptomycine, 1% de glutamine et 1% d'acides aminés non essentiels. Les cellules d'insectes Sf9 ont été propagées dans du milieu Sf-900 II SFM contenant 1% de pénicilline/streptomycine et 0,5% d'amphotéricine B. Les cellules d'insectes Tn High 5 ont été propagées dans du milieu Express High Five[™] contenant 1% de pénicilline/streptomycine, 0,5% d'amphotéricine B et 9% de glutamine.

3.2.2 Production de baculovirus recombinant

La production de baculovirus recombinant a été effectuée tel que décrit par la compagnie Gibco Life Technologies et tel qu'illustré (Figure 9).

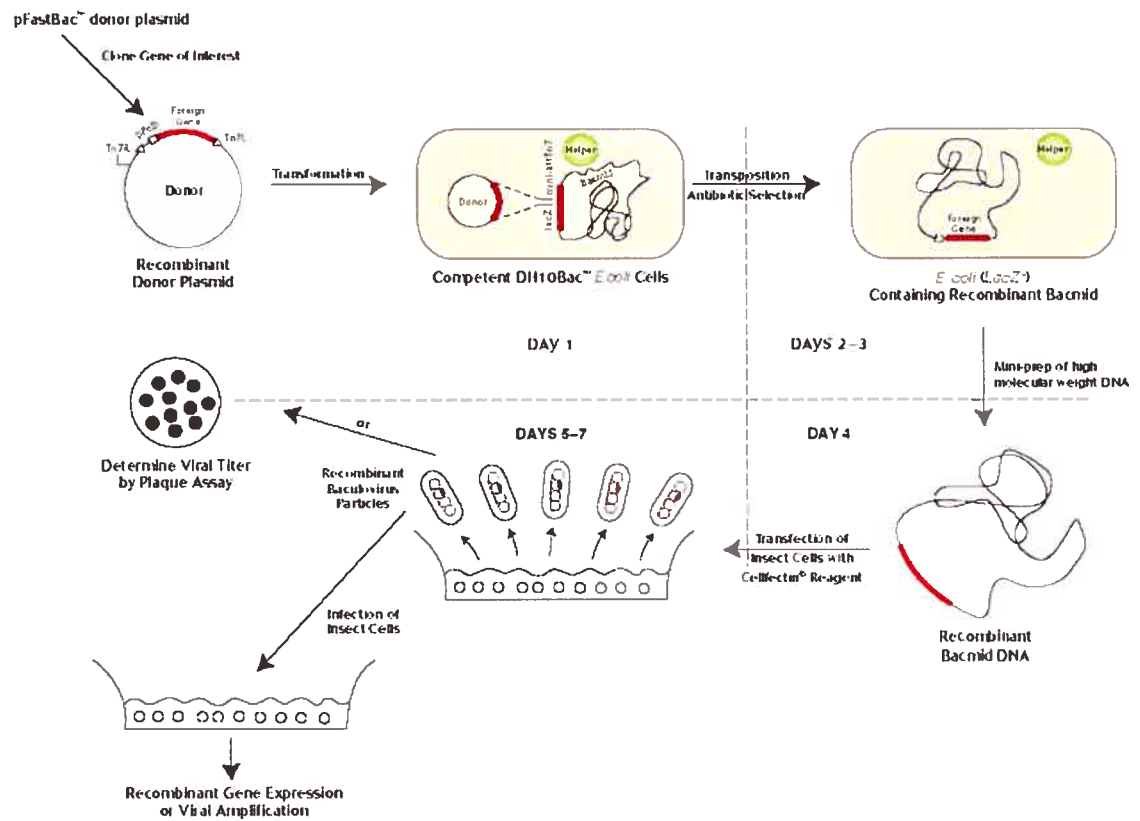


Figure 9. Schéma du système d'expression *Bac-to-Bac*®. (source : Gibco Life Technologies)

3.2.2.1 Amplification et mutagenèse dirigée du segment S1

Le segment S1 de réovirus de sérotype 3 a été amplifié à partir d'un clone de laboratoire en utilisant les amorces S1 5' ECO (5'-GCGGCGGGAATTCGTAGGATGGATCCTCGCCTA-3') et S1 3' STOP XBA (5'-GCGGCGTCTAGATCACGTGAAACTACG-3'). Pour effectuer la substitution d'acide aminé E36D, l'amorce 5'-CTCGGCGCTCGACAAGACGTCTCAAAT-3' a été utilisé; pour la substitution E36Q, l'amorce 5'-CTCGGCGCTCCAGAAGACGTCTCAAAT-3' a été utilisée et pour la substitution D54N, l'amorce 5'-ATCACCCAGGGACTCAATGATGCAAACAAACGA-3' a été utilisée. Les segments S1, sauvage ou contenant une mutation, ont été clonés dans le vecteur pFastBac en utilisant les enzymes de restriction *EcoRI* et *XbaI*.

3.2.2.2 Transposition du segment S1 dans le bacmide

Des bactéries *Escherichia coli* DH10Bac contenant le bacmide ont été transformées avec les plasmides pFastBac contenant le segment S1 sauvage ou mutant. Les bactéries transformées contenant un bacmide recombinant ont été sélectionnées sur un milieu LB agar contenant 50µg/mL de kanamycine, 7 µg/mL de gentamicine, 10 µg/mL de tétracycline, 100 µg/mL de Bluo-gal, 40 µg/mL d'IPTG. Seules les colonies de *Escherichia coli* blanches, par inactivation du gène β -galactosidase du bacmide, sont récupérées pour en extraire le bacmide recombinant.

3.2.2.3 Isolement du bacmide recombinant

L'isolement du bacmide recombinant (plasmide de plus de 100 kb) a été effectué en utilisant un protocole de mini préparation adapté pour les plus grands plasmides. Essentiellement, les colonies blanches choisies ont été amplifiées dans 2 mL de LB contenant 50 µg/mL de kanamycine, 7 µg/mL de gentamicine, 10 µg/mL de tétracycline à 37°C pendant 24 heures à 250 rpm. De cette culture, 1,5 mL a été transféré dans un tube à minicentrifugeuse et centrifugé à 14 000 g pendant 1 minute. Le surnageant est enlevé et le culot est resuspendu dans 0,3 mL de la solution I [15 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 100 µg/mL ARNase A]. Dans chaque tube a été rajouté 0,3 mL de la solution II (0,2 N NaOH, 1% SDS) en mélangeant légèrement. Les tubes ont été incubés à la température de la pièce pendant 5 minutes. Ensuite, 0,3 mL d'une solution de 3 M acétate de potassium (pH 5,5) a été ajoutée doucement dans chaque tube. Les échantillons sont placés sur glace pendant 10 minutes. Par la suite, les tubes sont centrifugés à 14 000 g pendant 10 minutes. Après la centrifugation, le surnageant est transféré dans un tube contenant 0,8 mL d'isopropanol. Le tube est mélangé légèrement et placé sur glace pendant 10 minutes. Une centrifugation à 14 000 g pendant 15 minutes à la température de la pièce est ensuite effectuée. Le surnageant est éliminé et le culot lavé avec 0,5 mL d'éthanol 70%. Une centrifugation à 14 000 g pendant 5 minutes à la température de la pièce est effectuée à nouveau. Le surnageant est enlevé et le culot séché à l'air pendant 10 minutes. Le bacmide est ensuite dissout dans 40 µL de TE. L'ADN est ensuite aliquoté à 5 µL par tube et conservé à -20°C.

3.2.2.4 Transfection des bacmides recombinants dans des cellules d'insectes Sf9

Les cellules Sf9 sont inoculées dans des plaques de six puits et incubées jusqu'à ce qu'elles atteignent la confluence. Dans un premier tube, 5 μ L du bacmide est mélangé avec 100 μ L de milieu Sf-900 II SFM sans antibiotiques (solution A). Dans un deuxième tube, 6 μ L de CELLFECTIN[®] est mélangé à 100 μ L de milieu Sf-900 II SFM sans antibiotiques (solution B). Les deux solutions (A et B) sont mélangées ensemble et incubées à la température de la pièce pendant 45 minutes. Les cellules Sf9 sont lavées avec 2 mL du milieu Sf-900 II SFM sans antibiotiques. À chacun des tubes contenant le mélange lipide-ADN, on ajoute 0,8 mL de milieu Sf-900 II SFM. Ce mélange final est déposé sur les cellules Sf9 et une incubation de 16 heures est effectuée à 27°C. Après cette incubation, le surnageant est enlevé et remplacé avec 2 mL de milieu Sf-900 II SFM contenant les antibiotiques. Après trois jours d'incubation, 1 mL de la suspension virale est récolté et utilisé pour infecter à nouveau des cellules Sf9 confluentes. Après trois jours d'incubation, les virus sont récoltés et gardés à -80°C.

3.2.3 Production des protéines μ 1, σ 3 et σ 1 à l'aide du système baculovirus

Des cellules Tn High 5 sont inoculées à 1×10^7 cellules par pétri de 10 cm. Les cellules sont infectées avec 100 μ L de la suspension de baculovirus recombinant contenant soit les gènes M2 et S4 du réovirus T1L dans un même baculovirus, ou le gène S1 (sauvage ou mutant) du réovirus T3D ou T1L. L'adsorption se fait dans 1 ml de milieu Express High Five[™] pendant une heure à la température de la pièce. Après

cette heure d'incubation, les cellules sont recouvertes avec 9 ml de milieu et l'incubation se poursuit à 27°C pendant 96 heures. Par la suite, les cellules sont récoltées et centrifugées à 500 g pendant 5 minutes. Le surnageant est enlevé et les cellules sont lavées avec 5 mL de PBS (NaCl 137 mM, Na₂HPO₄•7H₂O 8,1 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, KCl 2,7 mM). Les cellules sont à nouveau centrifugées à 500 g pendant 5 minutes. Le culot est ensuite resuspendu dans 800 µL de tampon de lyse (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 0.1 M NaCl, inhibiteurs de protéases). Les échantillons sont incubés sur glace pendant 30 minutes et centrifugés à 12 000 rpm pendant 20 minutes à 4°C dans un rotor Sorvall® F-20/Micro. Le surnageant est récupéré et gardé à -80°C.

3.2.4 Production d'inoculum de réovirus infectieux

Les cellules fibroblastiques de souris L929 ont été infectées avec du réovirus T3D à une multiplicité d'infection de 1. Après 48 heures d'infection, les cellules sont lysées par trois cycles de congélation/décongélation à -80°C directement dans le milieu de culture. Le surnageant est utilisé comme source de virus infectieux et est conservé à -80°C jusqu'à utilisation. Le milieu utilisé pour un passage viral est du MEM contenant, 2% de sérum de veau fœtal décomplémenté, 1% de pénicilline/streptomycine et 1% de glutamine.

3.2.5 Titrage viral

Des dilutions décimales du réovirus sont effectuées de 10^0 à 10^{-8} . Une plaque de 96 puits estensemencée avec 1×10^4 cellules L929 par puit. La première rangée de 12 puits contient le contrôle positif de virus non dilué (10^0). Les rangées deux à sept sont infectées par les dilutions 10^{-3} à 10^{-8} respectivement. La dernière rangée sert de contrôle négatif sans virus. L'adsorption se fait à 4°C pendant une heure dans 50 μL de milieu MEM contenant 2% de sérum de veau fœtal décomplémenté, 1% de pénicilline/streptomycine et 1% de glutamine. Le titrage se poursuit dans un volume total de 150 μL par puit. À sept jours post-infection, le titre viral en DICT_{50} (dose infectieuse en culture de tissue 50%) est calculé de la façon suivante (Reed, 1932) :

On détermine les deux dilutions qui chevauchent le point où on obtient 50% des puits infectés. Ensuite on calcule le nombre de puits infectés à la dilution où plus de la moitié des puits sont infectés moins la moitié du nombre de puits par rangée (six). Ce résultat est divisé par le nombre de puits à la dilution où plus de la moitié des puits sont infectés moins le nombre de puits infectés à la dilution où il y a moins de la moitié des puits infectés. Le nombre final obtenu par le calcul est ajouté à la dilution formant un pourcentage de lyse plus grand que la moitié du nombre de puit pour donner le titre final. Voici en résumé la formule utilisée : $[(\% \text{ de puits infectés au dessus de } 50\%) - 50\%] / [(\% \text{ de puits infectés au dessus de } 50\%) - (\% \text{ de puits infectés en dessous de } 50\%)] \times (-1) + \log \text{ dilution au dessus de } 50\%$. Le résultat obtenu est ensuite inversé.

3.2.6 Production et purification de réovirus en grande quantité

Des cellules L929 sont cultivées en suspension jusqu'à atteindre environ $1,5 \times 10^9$ cellules totales dans un volume de 1,5 L. Les cellules sont récoltées par centrifugation à 2000 rpm dans un rotor Sorvall® GSA pendant 5 minutes à 4°C et sont resuspendues dans 100 mL de milieu MEM. Les cellules sont infectées avec du réovirus de sérotype 3 à une multiplicité d'infection de 10. L'adsorption se fait à 4°C pendant 1 heure. Les cellules infectées sont ensuite mises en suspension dans 1 L de milieu MEM contenant 2% de sérum de veau fœtal décomplémenté (par incubation à 56°C pendant 30 minutes), 1% de pénicilline/streptomycine, 0,5% d'amphotéricine B et 1% de glutamine. L'infection se déroule à 30°C pendant 40 heures. Les cellules sont ensuite récupérées par centrifugation à 2000 rpm dans un rotor Sorvall® GSA pendant 5 minutes à 4°C. L'échantillon subit trois cycles de congélation/décongélation à -80°C. Les cellules sont resuspendues dans 25 mL de tampon d'extraction de virus (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM 2-Mercaptoethanol, 250 mM NaCl). Le virus est par la suite extrait avec 6,5 mL de fréon. Une centrifugation se poursuit dans des tubes Corex de 30 mL à 4°C pendant 10 minutes à 10 000 rpm dans un rotor Sorvall® SS-34. La phase supérieure contenant le virus est déposée sur un gradient de chlorure de césium (en solution dans du Tris-EDTA) d'une densité allant de $1,31 \text{ g/cm}^3$ à $1,42 \text{ g/cm}^3$. La préparation est ensuite centrifugée à 26 000 rpm pendant 1h30 dans un rotor Beckman SW4. La bande contenant le virus est ensuite récupérée et dialysée contre un tampon de Tris-HCl 100 mM à pH 8.0.

3.2.7 Recapsidation *in vitro*

Dans un premier temps, 100 μL de la production de réovirus en grande quantité est incubé avec 5 μg de α -chymotrypsine pendant 1 heure à 37°C pour former des *cores*. Pour arrêter l'activité de la chymotrypsine, 8 μL d'une solution d'inhibiteurs de protéases (Complete[®] EDTA-free) 25X est ajouté au tube. À l'échantillon de *cores* sont ajoutés 300 μL d'extrait de protéines $\mu\text{l}/\sigma\text{3}$ recombinantes, 300 μL d'extrait de protéine σ1 recombinante et 24 μL d'inhibiteurs de protéases 25X. Le mélange est incubé à 37°C pendant 2 heures. Les *cores* recapsidés sont déposés sur 500 μL d'un coussin de chlorure de césium d'une densité de 1,22 g/cm^3 et purifiés par une centrifugation à 12 000 rpm pendant 1 heure à 4°C dans un rotor Sorvall[®] F-20/Micro. Le surnageant est enlevé et le culot est lavé avec 1 mL de tampon de virion (150 mM NaCl, 10mM MgCl_2 , 10 mM Tris-HCl pH 8,0). Une deuxième centrifugation à 12 000 rpm est effectuée pendant 30 minutes à 4°C dans un rotor Sorvall[®] F-20/Micro. Le surnageant est à nouveau enlevé et le culot est resuspendu dans 200 μL de tampon de virion.

3.2.8 Production d'ISVP à partir des *cores* recapsidés

Les *cores* recapsidés ont été dilués 1 dans 5. Cet échantillon a ensuite été traité avec 5 μg de α -chymotrypsine pendant 30 minutes à 37°C. La réaction de digestion a été arrêtée avec 8 μL de la solution d'inhibiteurs de protéases 25X.

3.2.9 Immunobuvardage et immunoprécipitation

3.2.9.1 *Marquage métabolique*

Les cellules sont incubées pendant une heure dans du milieu complet sans méthionine ni cystéine. Les protéines cellulaires totales sont marquées en incubant les cellules avec 25 $\mu\text{Ci/mL}$ de Méthionine/Cystéine marquée au ^{35}S pendant deux à trois heures.

3.2.9.2 *Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)*

L'électrophorèse de protéines a été effectuée sur des gels de polyacrylamide 10%. La migration est effectuée pendant quatre heures à 45 mA par gel ou pendant 18 heures à 60 V dans du tampon de migration (Tris 0,025 mM, Glycine 0,067 mM, SDS 0,1%). Le tampon utilisé pour charger les protéines sur gel est le tampon Laemmli (glycérol 10%, bleu de bromophénol 0,05%, β -mercaptoéthanol 5%, SDS 2%, Tris 0,0625 mM pH 6,8). Le standard de poids moléculaire utilisé pour mesurer la masse moléculaire des protéines est le *Bench Mark Protein Ladder* allant de 182 kDa à 16 kDa.

3.2.9.3 Immunobuvardage de type Western

Après la migration, les protéines du gel sont transférées sur une membrane de nitrocellulose dans du tampon de transfert (Tris 25 mM, Glycine 193 mM, méthanol 20%) à 75 mA pendant 18 heures. Après le transfert, la membrane est rincée deux fois avec 20 mL de TBS (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, NaCl 150 mM). La membrane est ensuite bloquée avec du tampon TBS contenant 5% de lait écrémé en poudre (en provenance de chez Carnation) pendant une heure à la température de la pièce. Par la suite, la membrane est recouverte avec 20 mL de tampon TBS-lait (5%) contenant 10 µL d'un anticorps polyclonal hétérosécificique anti-réovirus de sérotype 3 (dilution finale 1 :2000). L'incubation se poursuit pendant une heure à la température de la pièce. Après cette incubation avec l'anticorps primaire, la membrane est lavée trois fois avec du tampon TBS contenant 0,1% de Tween 20. Une incubation d'une heure se poursuit à la température de la pièce avec 20 mL de tampon TBS-lait (5%) contenant 10 µL d'un anticorps secondaire anti-immunoglobuline de lapin (dilution finale 1 :2000) couplé soit à la phosphatase alcaline soit à la peroxydase. Après cette incubation avec l'anticorps secondaire, la membrane est à nouveau lavée trois fois avec du tampon TBS contenant 0,1% de Tween 20. La présence d'anticorps liés aux protéines est révélée par chimioluminescence (anticorps couplé à la peroxydase) avec 150 µL de luminol, 25 µL d'acide coumarique et 2,8 µL de peroxyde d'hydrogène (30%) dans un volume total de 10 mL de Tris 100 mM à pH 10,2. La révélation s'est fait aussi par la formation d'un précipité (anticorps couplé à la phosphatase alcaline) en utilisant comme substrat les

composés NBT/BCIP dilués 1 :10 dans du tampon phosphatase (Tris 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM, ajusté avec du HCl à pH 9,2).

3.2.9.4 Immunoprécipitation

Les extraits de cellules d'insectes High Five radiomarqués et lysés sont incubés avec 4 µL d'anticorps monoclonal anti-σ1 de réovirus T3D à 4°C pendant 18 heures. Après cette incubation, 200 µL d'agarose couplé à la protéine G est ajouté dans les tubes et l'incubation se poursuit pour deux heures à 4°C. Par la suite, l'agarose est centrifugé à 12 000 rpm pendant 5 minutes à 4°C dans un rotor Sorvall® F-20/Micro. Le culot est lavé trois fois avec du tampon d'immunoprécipitation sans déoxycholate (NaCl 140 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, NaH₂PO₄ 2mM, NP40 1%, SDS 0,05%) et une dernière fois avec du tampon Tris-NaCl (Tris 0,05 M pH 7,2, NaCl 0,15 M). Pour libérer les protéines, l'agarose est resuspendu dans du tampon Laemmli et les échantillons sont portés à ébullition pendant cinq minutes. Finalement, l'agarose est centrifugé à 12 000 rpm dans un rotor Sorvall® F-20/Micro pendant 5 minutes et le surnageant est déposé sur un gel de polyacrylamide.

3.2.10 Test d'infectivité

L'infectivité des particules recapsidées avec les différents mutants de la protéine σ1 et transformées en ISVPs a été analysée soit par immunobuvardage ou marquage métabolique de cellules infectées soit par titrage en plaque de 96 puits.

3.2.10.1 Analyse de la production de protéines virales

Pour tester l'infectivité des particules recapsidées, un dixième (20 μ L) de ces particules recapsidées avec les protéines μ 1, σ 3 et σ 1 transformées ou non en ISVP est inoculé sur 3×10^6 cellules L929 dans des pétris de 10 cm ou bien sur des cellules MDCK, MDCK-mucine ou Caco-2 confluentes dans des pétris de 5 cm. Après une incubation de 24 heures à 37°C, le surnageant est récupéré et les cellules sont récoltées en utilisant 1 mL de PBS-EGTA (NaCl 137 mM, Na₂HPO₄•7H₂O 8,1 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, KCl 2,7 mM, EGTA 0,5 M). Les cellules sont centrifugées à 2000 rpm pendant 10 minutes à 4°C dans un rotor Sorvall® F-20/Micro. Les cellules sont resuspendues et lysées dans 100 μ L de RIPA-Doc (NaCl 140 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, NaH₂PO₄ 2mM, NP40 1%, DOC 0,5%, SDS 0,05%). Les protéines solubles sont récoltées dans le surnageant après une centrifugation à 12 000 rpm pendant 20 minutes à 4°C dans un rotor Sorvall® F-20/Micro. La production de protéines virales suite à l'infection est analysée soit par immunobuvardage soit par un marquage métabolique effectué avant la récolte des protéines.

3.2.10.2 Analyse de l'activité mucinolytique par titrage

Dans un premier temps, des dilutions décimales des *cores* recapsidés, transformés ou non en ISVP, sont effectuées de 10⁰ à 10⁻⁸. Une plaque de 96 puits estensemencée avec 1×10^5 par puit de cellules MDCK ou MDCK-mucine dans du milieu contenant 50% de Ham-F12, 50% de DMEM, 3% de sérum de veau fœtal

décomplémenté, 1% de pénicilline/streptomycine et 1% de glutamine. Les cellules sont infectées trois jours post-confluence. La première rangée de 12 puits contient le contrôle de virus non dilué (10^0). Les rangées deux à sept sont infectées par les dilutions 10^{-3} à 10^{-8} respectivement. La dernière rangée sert de contrôle négatif sans virus. L'adsorption se fait à 4°C pendant une heure dans $50\ \mu\text{L}$ de milieu. Après l'heure d'adsorption, les plaques sont lavées deux fois avec $100\ \mu\text{L}$ de PBS. Le titrage se poursuit dans un volume total de $100\ \mu\text{L}$ de milieu par puit. À cinq jours post-infection, les plaques subissent trois cycles de congélation/décongélation à -80°C . Ensuite, $50\ \mu\text{L}$ du surnageant de chaque puit est transféré dans un puit correspondant sur une plaque de 96 puits contenant 1×10^5 de cellules L929 par puit. Le titrage se poursuit comme mentionné plus haut (section 3.2.5).

4. Résultats

4.1 Mutagenèse du site actif et clonage du segment S1

La première étape pour l'obtention des protéines nécessaires à la réalisation du projet était d'effectuer les mutations dans la séquence codante du site actif de l'activité mucinolytique de $\sigma 1$. Pour ce faire, la technique du *mégaprimé* a été utilisée avec les amorces citées plus haut. Ainsi, les substitutions d'acide aminé E36Q, E36D et D54N ont été générées dans le but d'inactiver le site catalytique en remplaçant les acides aminés responsable de l'hydrolyse par des acides aminés portant la même chaîne latérale mais ne possédant aucune charge. En utilisant un clone de laboratoire contenant le fragment S1 intact, le plasmide pPicS1, un premier cycle de PCR a été effectué avec l'amorce ECO en 5' et les amorces mutagéniques en 3' individuellement. Les fragments générés ont ensuite été utilisés pour une deuxième étape de PCR avec l'amorce en 3' STOP XBA. Le fragment S1 sauvage a été généré par une seule étape de PCR avec l'utilisation des amorces ECO en 5' et STOP XBA en 3'. Les fragments ainsi formés ont été digérés avec les enzymes de restriction *EcoRI* et *XbaI* pour pouvoir les introduire par ligation dans le plasmide pFastBac préalablement digéré avec ces mêmes enzymes. Le succès de l'obtention des plasmides recombinants a été vérifié par digestion avec les enzymes ayant servi au clonage ainsi que par PCR avec les amorces ECO et STOP XBA. Puisque dans la substitution d'acide aminé E36D et E36Q il y a la perte d'un site *XhoI* sur le segment S1, les produits de PCR ont été digérés avec cette enzyme et on peut voir qu'effectivement il y a bien eu mutation à l'endroit désiré

(Figure10). La confirmation de la création des mutations désirées a été effectuée par séquençage des plasmides pFastBac-S1. Ces plasmides recombinants ont par la suite été transformés dans des bactéries DH10Bac pour qu'il y transposition des segments S1 sauvage et mutants dans le génome du baculovirus sous le contrôle du promoteur du gène de la polyhédrine. Les colonies d'*Escherichia coli* blanches, dû à l'inactivation du gène *lacZ*, ont été isolées pour en extraire les bacmides recombinants et un PCR a été effectué à nouveau sur ces bacmides pour vérifier la présence du segment S1.

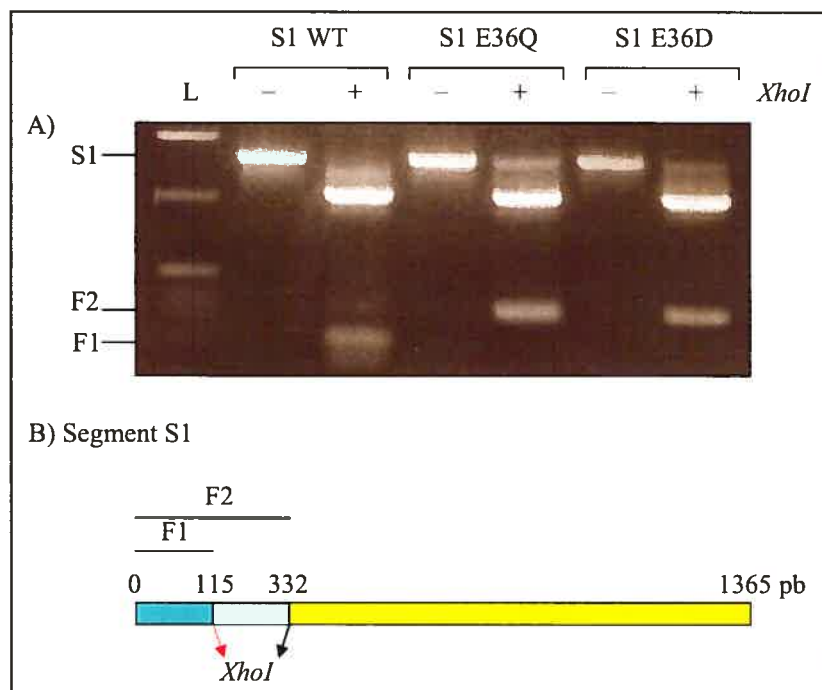


Figure 10. Amplification du segment S1 à partir de pFastBac-S1 et vérification de la perte d'un site *XhoI* chez les mutants E36D et E36Q.

A) Pour vérifier la perte du site *XhoI* chez les mutants E36D et E36Q, les produits de PCR ont été digérés avec l'enzyme *XhoI* pendant 2 heures à 37°C. La migration des fragments d'ADN s'est déroulée sur un gel d'agarose 1% pendant 1 heure à 100 V dans du tampon TAE. **B)** Schéma du segment S1. S1: segment S1; WT: segment S1 de type sauvage; L: marqueur de taille moléculaire; pb: paire de bases; -: absence d'enzyme *XhoI*; +: présence d'enzyme *XhoI*; flèche rouge: site *XhoI* éliminé par la substitution d'acide aminé E36D et E36Q.

4.2 Expression des protéines $\mu 1$, $\sigma 3$ et $\sigma 1$

Une fois les bacmides extraits des cellules bactériennes, ils ont été transfectés dans des cellules Sf9 pour produire les baculovirus recombinants. Lorsque ces derniers sont produits, les cellules d'insecte High Five, cellules ayant la capacité d'exprimer de grandes quantités de protéines recombinantes, ont été infectées par ces virus. Les protéines ont été récoltées quatre jours post-infection. Dans le cas des protéines $\mu 1$ et $\sigma 3$, nous avons déjà un baculovirus recombinant provenant d'un autre laboratoire exprimant les deux protéines au sein du même virus. Un des deux gènes est sous le contrôle du promoteur du gène de la polyhédrine et l'autre sous le contrôle du promoteur du gène p10. La détection de l'expression des protéines recombinantes a été effectuée par immunobuvardage avec l'anticorps polyclonal anti-réo dans le cas des protéines $\mu 1$ et $\sigma 3$ et par immunoprécipitation avec l'anticorps monoclonal anti- $\sigma 1$ dans le cas des protéines $\sigma 1$ puisque dans ce dernier cas, nous avons un anticorps conformationnel ne permettant pas la détection des protéines par immunobuvardage. À la figure 11, il est possible de voir l'expression des protéines majeures de la capsid externe de réovirus $\mu 1$ et $\sigma 3$ dans les cellules d'insectes High Five. Il est à noter que la présence des protéines virales recombinantes dans l'extrait cellulaire n'a pu être observée par coloration au bleu de Coomassie, probablement dû au fait que l'expression n'était pas à son maximum. Il a par contre été possible d'observer les protéines par immunobuvardage quoique la détection de la protéine $\sigma 3$ est nettement plus faible dans cet essai. Une explication de cette différence réside dans le fait que le promoteur p10, sous lequel $\sigma 3$ est contrôlé, est moins fort que le promoteur du gène de la polyhédrine

qui contrôle dans notre cas la protéine $\mu 1$. La figure 12 nous montre l'expression des protéines $\sigma 1$ dans les cellules High Five. Toutes les protéines $\sigma 1$ semblent être exprimées à des niveaux similaires et les mutations ne semblent pas affecter la synthèse protéique tout comme dans l'étude de Bisailon *et al.* (Bisailon, 1999) où l'expression protéique s'est fait chez la levure *Pichia pastoris*. L'expression des protéines $\sigma 1$ confirme encore une fois l'obtention des bacmides recombinants contenant les segments S1, sauvage ou muté.

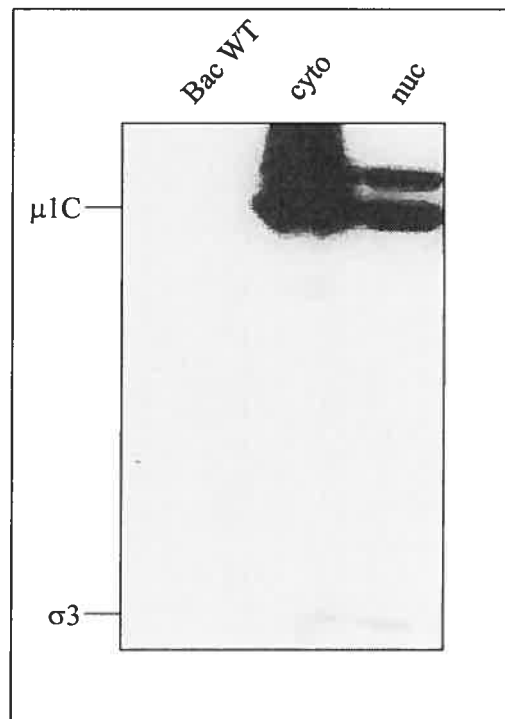


Figure 11. Expression des protéines $\mu 1$ et $\sigma 3$.

Un volume de 100 μ L de chacun des échantillons de protéines a été déposé sur un gel de polyacrylamide 10%. La présence de protéines recombinantes a été détectée avec un anticorps anti-réovirus et un anticorps secondaire couplé à la peroxydase (HRPO). Bac WT: protéines provenant d'un extrait cellulaire infecté avec du baculovirus de type sauvage; cyto: extrait cytoplasmique de cellules infectées avec le baculovirus-M2/S4; nuc: extrait nucléaire de ces mêmes cellules.

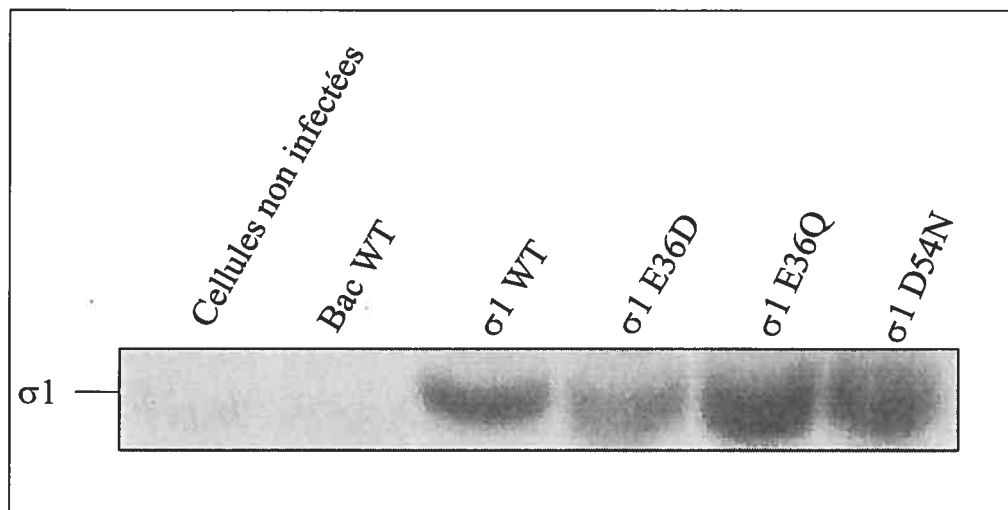


Figure 12. Expression des protéines $\sigma 1$ dans des cellules Tn High Five.

Les cellules d'insectes ont été marquées deux heures à 27°C. La protéine $\sigma 1$ a été isolée par immunoprécipitation avec un anticorps monoclonal anti- $\sigma 1$. Un volume de 100 μL de tampon Laemmli est utilisé pour resuspendre les protéines immunoprécipitées qui sont déposées sur un gel de polyacrylamide 10 %. Bac WT: extrait cytoplasmique de cellules High Five infectées avec un baculovirus de type sauvage.

4.3 Recapsidation *in vitro*

Une fois que les protéines virales recombinantes ont été obtenues, une expérience de recapsidation *in vitro* a pu être menée avec des *cores* préalablement formés. Il est essentiel d'obtenir des particules virales ne possédant aucune des protéines de la capsid externe. De plus, il est primordial que les protéines recombinantes $\mu 1$, $\sigma 3$ et $\sigma 1$ puissent se lier à nouveau sur ces *cores* dénudés. Un premier essai a été effectué avec des *cores* et des protéines $\mu 1$ et $\sigma 3$ seules. Il est

possible de voir à la figure 13 la formation de *cores* puisqu'il n'y a aucune détection des protéines majeures de la capsid externe avec l'anticorps anti-réovirus utilisé lors de l'immunobuvardage pour cet échantillon. Par ailleurs, on peut voir que l'expression des protéines recombinantes peut être détectée en ayant recours à la méthode d'immunobuvardage utilisant un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline et un substrat chromogénique. Lorsque les *cores* sont incubés avec les protéines $\mu 1$ et $\sigma 3$, on peut voir que ces dernières peuvent passer au travers du coussin de chlorure de césium ($1,22 \text{ g/cm}^3$) alors que les protéines $\mu 1$ et $\sigma 3$ seules sans *cores*, une fois incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon avec *cores*, ne peuvent pas passer au travers du coussin puisqu'aucune protéine ne peut être détectée. La présence de la protéine $\mu 1$ indique de façon indirecte que les protéines se sont bien liées aux *cores* puisque seuls les *cores* ont la densité requise pour passer au travers du coussin de chlorure de césium et se retrouver au fond du tube entraînant par le fait même les protéines de la capsid externe. Un résultat similaire est obtenu lorsque l'extrait de cellules d'insectes contenant la protéine $\sigma 1$ est ajouté à la réaction de recapsidation. Encore une fois, lorsqu'il y a présence de *cores* dans l'échantillon, on peut voir que les protéines se retrouvent entraînées dans le fond du tube avec les *cores* alors que lorsque un échantillon similaire est incubé sans *cores*, aucune protéine ne peut être détectée par immunobuvardage.

Il est à noter que la quantité de protéines recapsidées sur les *cores* est moindre que la quantité de protéines se trouvant de façon naturelle sur le virion. De plus, il est impossible d'observer la recapsidation de la protéine $\sigma 1$ de façon directe car l'anticorps

utilisé reconnaît principalement les protéines majeures de la capsid externe $\mu 1$ et $\sigma 3$ quoique la détection de cette dernière est plus faible que celle de $\mu 1$. Ceci explique pourquoi il est impossible de voir la présence $\sigma 3$ sur les *cores* recapsidés vu la plus faible présence de protéines dans ces échantillons. La même expérience a été effectuée en colorant le gel au bleu de Coomassie pour essayer de voir s'il était possible de détecter la présence des protéines recapsidées sur les *cores*. Il était seulement possible de voir la présence de la protéine $\mu 1$ alors que les autres protéines restaient indétectables. Il y avait présence de contaminants cellulaires à la hauteur des protéines $\sigma 3$ et $\sigma 1$ empêchant par le fait même l'observation de ces dernières (résultat non montré). Par ailleurs, une expérience d'immunoprécipitation a été menée avec des protéines $\sigma 1$ radioactives recapsidées sur des *cores* mais celle-ci c'est avérée infructueuse (résultat non montré). Par contre, il a été possible de mesurer de façon indirecte la recapsidation des protéines $\sigma 1$ sur les *cores* en faisant un test d'infectivité des particules recapsidées sur des fibroblastes de souris L929.

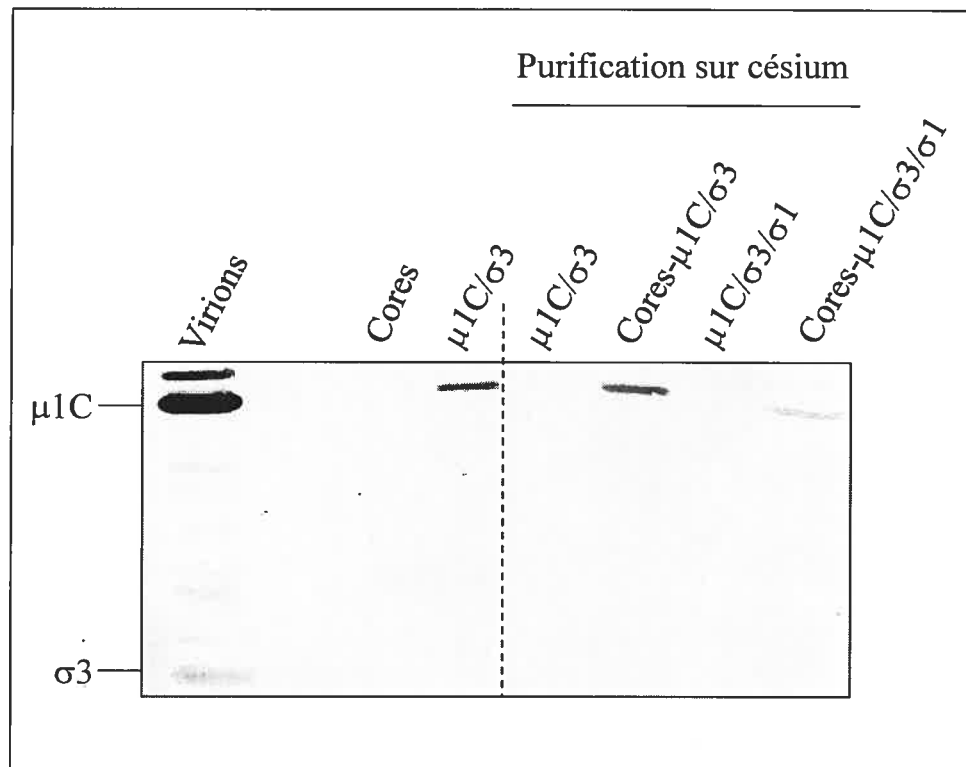


Figure 13. Recapsidation *in vitro*.

La purification des particules recapsidées ou des protéines contrôles a été effectuée sur un coussin de chlorure de césium d'une densité de 1,22 g/cm³. Un volume de 10μL de réovirus sauvage ainsi qu'un volume équivalent de *cores*, de protéines recombinantes ou de *cores* recapsidés a été déposé sur gel. La migration s'est déroulée sur un gel de polyacrylamide 10%. La présence de protéines recombinantes a été détectée avec un anticorps anti-réovirus et un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline.

4.4 Infectivité des particules recapsidées sur cellules L929

Étant donné que les résultats précédents suggèrent que la réaction de recapsidation fonctionne dans les conditions utilisées, une première tentative d'infection des cellules L929 a donc été effectuée. Puisque les fibroblastes de souris

L929 sont un modèle classique d'infection efficace chez le réovirus, il s'agissait de s'assurer que l'infectivité des particules recapsidées avec les protéines recombinantes était adéquate dans cette lignée cellulaire pour la poursuite du projet. Dans un premier temps, un test d'infectivité a été mené avec des *cores*, des *cores* recapsidés avec les protéines $\mu 1/\sigma 3$ et des *cores* recapsidés avec les protéines $\mu 1/\sigma 3$ et $\sigma 1$ de type sauvage; Le réovirus T3D sauvage initialement utilisé pour la préparation des *cores* a été utilisé comme contrôle. L'infectivité a été mesurée par immunobuvardage en utilisant un anticorps anti-réovirus de sérotype 3. Tout d'abord, les *cores* ne semblent pas infectieux en comparaison avec le réovirus sauvage car aucune protéine pour cet échantillon ne peut être détectée avec l'anticorps utilisé (Figure 14A). Si on compare l'infectivité des *cores* avec celle des *cores* recapsidés par les protéines $\mu 1$ et $\sigma 3$, on voit une légère augmentation de la production de protéines virales suite à l'infection. Ceci peut être expliqué en partie par le fait que la protéine $\mu 1$ permet au virus de pénétrer la membrane plasmique. Dans le cas où l'on rajoute aussi la protéine d'attachement $\sigma 1$, l'infectivité se voit alors augmentée de plusieurs fois (Figure 14A). Il est important toutefois de reconnaître que le recouvrement total de l'infectivité n'est pas atteint par recapsidation puisque le réovirus sauvage est toujours plus infectieux que les particules recapsidées. Ce résultat confirme que la protéine $\sigma 1$ s'est bien incorporée sur les *cores*. Il est à noter aussi qu'il y a une légère différence entre l'infectivité des particules recapsidées avec la protéine $\sigma 1$ de sérotype T1L et celle des particules recapsidées avec la protéine $\sigma 1$ de sérotype T3D. Bien que les particules virales soient recapsidées avec des protéines $\mu 1$ et $\sigma 3$ de sérotype T1L et que l'anticorps utilisé devrait reconnaître seulement les protéines $\mu 1$ et $\sigma 3$ du réovirus de sérotype T3D, nous avons voulu

vérifier que nous ne détectons pas des protéines résiduelles de la recapsidation qui se seraient liées aux cellules L929. Pour s'assurer que les protéines détectées par immunobuvardage sont synthétisées *de novo* et proviennent bien de l'infection par les particules recapsidées, un marquage métabolique a été effectué. Un contrôle supplémentaire a été rajouté soit des *cores* incubés avec des protéines provenant des cellules d'insectes High Five infectées par le baculovirus sauvage. L'ajout de ce contrôle visait à éliminer la possibilité, quoiqu'improbable, que les protéines du baculovirus puissent augmenter d'une façon quelconque l'infectivité des *cores*. L'apparition de la protéine virale σ_3 n'est observé que lorsque les cellules sont infectées avec des *cores* recapsidés avec μ_1 et σ_3 ou avec μ_1, σ_3 et σ_1 ce qui exclut cette possibilité d'une augmentation de l'infectivité par les protéines du baculovirus seules (Figure 14B). De plus, l'expérience de radiomarquage confirme les résultats précédemment obtenus par immunobuvardage indiquant l'importante augmentation d'infectivité suite à l'addition de σ_1 .

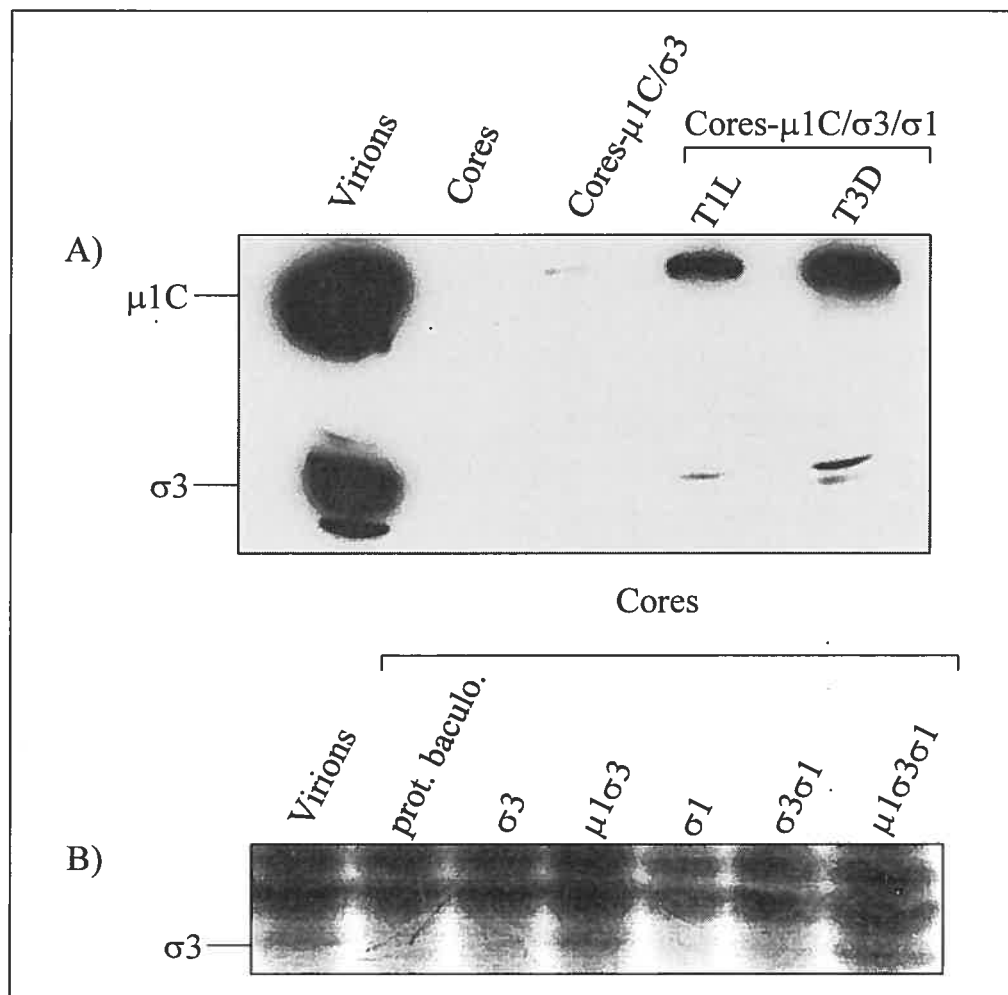


Figure 14. Infectivité des *cores* recapsidés (r-Virions) dans les cellules L929.

A) Immunobuvardage à partir d'extrait de cellules fibroblastiques L929 à l'aide d'un anticorps anti-réovirus T3D. T1L: cellules infectées avec des particules recapsidées portant la protéine $\sigma 1$ T1L; T3D: cellules infectées avec des particules recapsidées portant la protéine $\sigma 1$ T3D. B) Marquage métabolique de cellules L929 infectées par les particules virales recapsidées. La position de la protéine $\sigma 3$, indiquant la présence d'infection, est indiquée.

4.5 Production d'ISVPs à partir de *cores* recapsidés

La prochaine étape du projet était de produire des ISVPs à partir des *cores* recapsidés. Lors de la réaction de recapsidation, nous avons utilisé des protéines non purifiées et il y a donc la présence de grandes quantités de protéines non spécifiques qui pourraient interférer avec l'activité des protéases. Des quantités croissantes de chymotrypsine ont alors été testées dans un premier temps afin de déterminer la concentration idéale de chymotrypsine permettant de produire des ISVPs *in vitro* à partir des virions formés par recapsidation. La concentration de chymotrypsine qui semblait la plus efficace pour former des ISVPs était une concentration de 50 µg/mL (résultat non montré). Puisqu'il était difficile de détecter le fragment δ propre aux ISVPs avec l'anticorps monoclonal anti- μ 1 utilisé, on s'est fié à l'observation de la perte du fragment μ 1C. Pour confirmer qu'on était bien en présence d'ISVPs, l'infectivité a tout d'abord été examinée sur des cellules L929 en présence de chlorure d'ammonium qui permet seulement aux ISVPs de compléter leur cycle de réplication en bloquant la décapsidation des virions à l'intérieur des endosomes. Cette expérience a bel et bien confirmé la formation d'ISVP puisque seuls les r-ISVPs apparaissent infectieux et capables de produire les protéines virales détectées par immunobuvardage alors qu'en présence de NH_4Cl , les r-virions, obtenus par recapsidation des *cores*, sont incapables de se répliquer (Figure 15).

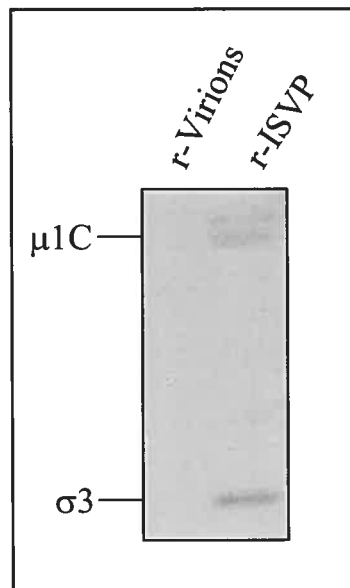


Figure 15. Formation d'ISVPs à partir de *cores* recapsidés.

Pour confirmer la formation d'ISVPs une infection s'est déroulée dans des cellules fibroblastiques L929 en présence de 100 μ M de NH_4Cl pendant 24 heures. r-Virions: *cores* recapsidé avec les protéines $\mu 1, \sigma 3, \sigma 1$; r-ISVP: échantillon de *cores* entièrement recapsidés et transformé en ISVP.

4.6 Infectivité des ISVPs portant les différents mutants de $\sigma 1$

Par la suite, puisque nous avons bien obtenu des ISVPs, il fallait vérifier que les r-ISVPs contenant les différents mutants de $\sigma 1$ maintiennent leur infectivité dans les fibroblastes de souris L929 et que les mutations dans le site catalytique de $\sigma 1$ n'empêchent pas l'infectivité du réovirus en tant que telle. Comme on peut le voir, l'infectivité des r-ISVPs portant les différents mutants de $\sigma 1$ est semblable à celle des r-ISVPs portant la protéine $\sigma 1$ de type sauvage puisque l'intensité des protéines virales détectées par immunobuvardage apparaît relativement identique d'un échantillon à

l'autre (Figure 16). Par contre, l'intensité des bandes correspondantes aux protéines $\sigma 3$ E36D et $\sigma 3$ E36Q est légèrement plus faible que l'intensité de la bande correspondante à la protéine $\sigma 3$ de type sauvage. Cette variabilité peut, entre autres, être le résultat d'une plus faible quantité de protéines utilisées lors de la recapsidation ou un effet des mutations effectuées au sein du site actif de $\sigma 1$. Quoiqu'il en soit, l'infectivité des ces particules est assez importante pour poursuivre l'étude sur des cellules exprimant la mucine.

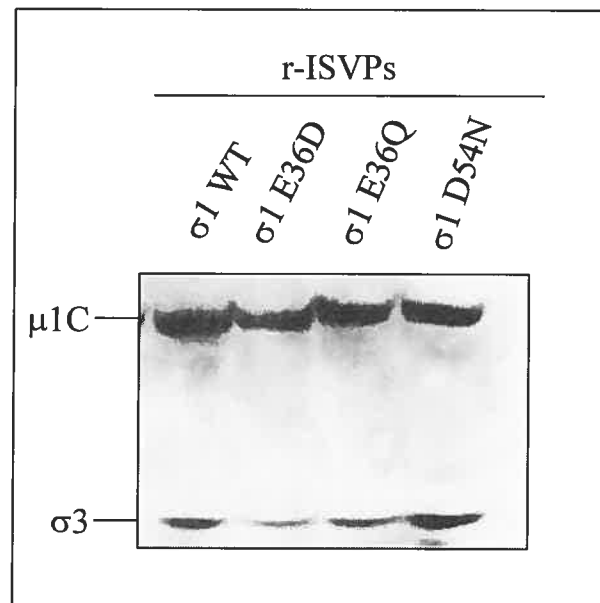


Figure 16. Infectivité des r-ISVPs portant les différents mutants de $\sigma 1$.

Les fibroblastes de souris L929 ont été infectés avec un dixième de la production d'ISVP. La détection des protéines virales est effectuée avec un anti-réovirus T3D.

4.7 Infectivité des ISVPs dans les cellules Caco-2

Les mutations dans le site catalytique de $\sigma 1$ ne semblent donc pas nuire de façon importante quant à l'infectivité des particules virales sur des fibroblastes L929, cellules qui n'expriment pas de mucine à leur surface. La prochaine étape consistait donc à vérifier quel était l'effet de ces mutations sur l'infectivité des particules virales en présence de cellules exprimant la mucine. Dans un premier temps nous avons exploré l'infectivité des différents ISVPs sur des cellules épithéliales Caco-2, un clone cellulaire provenant d'un cancer intestinal humain. Cette lignée cellulaire offrait l'avantage de provenir du site d'infection naturelle du réovirus et ces cellules synthétisent donc plusieurs types de mucines que le virus peut potentiellement rencontrer lors d'une infection chez l'hôte naturel. Le seul inconvénient de l'utilisation de cette lignée cellulaire est que la différenciation cellulaire se fait de façon aléatoire et non synchronisée, ce qui laisse place au doute que certains virus puissent infecter des cellules n'exprimant pas de mucine à leur surface lors de l'expérience. Effectivement, l'immunobuvardage pour révéler la présence de protéines virales après l'infection n'a démontré aucune différence d'un virus mutant à l'autre (Figure 17). Ce qui est intéressant par contre est le fait que le virion complet n'est pas du tout infectieux puisqu'aucune protéine n'est détectée. Bien qu'il n'y ait aucune différence quant à l'infectivité des r-ISVPs dans cette lignée cellulaire, le fait que les r-virions ne sont pas infectieux montre bien qu'il y a une différence notable entre l'infectivité d'un virion et d'un ISVP dans des cellules exprimant des mucines à leur surface. Un autre inconvénient de l'utilisation de la lignée Caco-2 est l'absence de cellules contrôles

analogues mais n'exprimant pas la mucine à sa surface pour vérifier si la différence d'infectivité entre virions et ISVPs est bel et bien due à la présence de mucine.

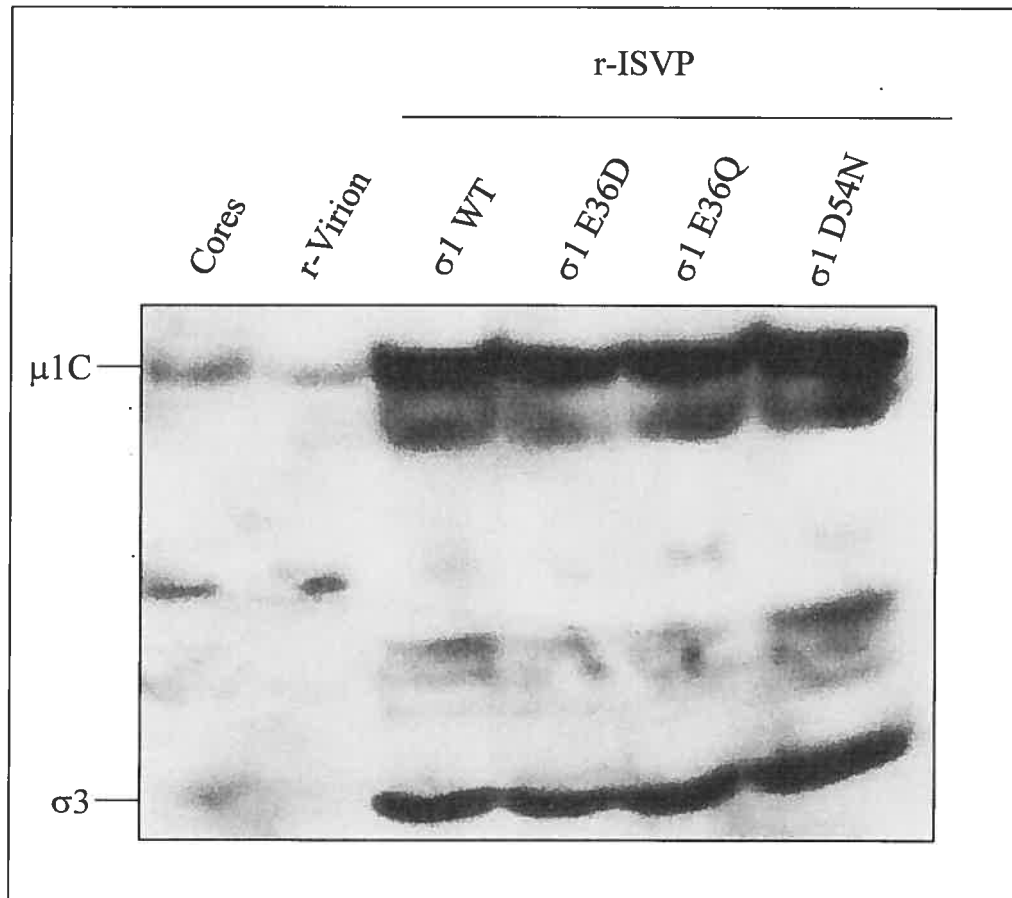


Figure 17. Infectivité des r-virions et des r-ISVPs dans les cellules Caco-2. Pour étudier l'infectivité des ISVPs portant les différents mutants de $\sigma 1$, des cellules Caco-2 ont été utilisées. Les protéines virales $\mu 1C$ et $\sigma 3$ sont détectées à l'aide d'un anti-réovirus. r-Virion: cores recapsidés avec les protéines $\mu 1C$, $\sigma 3$ et $\sigma 1$; r-ISVP: r-Virions traités pour former des ISVPs.

4.8 Infectivité des ISVPs dans les cellules épithéliales MDCK

Le test d'infectivité dans les cellules Caco-2 ne s'étant pas révélé fructueux, nous nous sommes tourné vers un essai qui avait déjà été utilisé dans le laboratoire pour mesurer la différence d'infectivité entre les virions et les ISVPs dans des cellules exprimant la mucine. Pour ce faire, nous avons eu recours aux cellules MDCK-MUC1, une lignée permanente obtenue par transfection du gène MUC1 permettant l'expression de la mucine transmembranaire de type 1 à la surface cellulaire. L'avantage de l'utilisation de cette lignée cellulaire est d'une part qu'il y avait à notre disposition des cellules contrôles n'exprimant pas la mucine. D'autre part, cet essai avait été bien établi pour mesurer la différence d'infectivité de façon quantitative entre les virions et les ISVPs. En effet, lors d'une étude précédente, il a été démontré qu'en présence de mucine, l'infectivité des virions diminue de près de 10 fois (1 log) en présence de mucine par rapport aux cellules contrôles alors que les ISVPs ont la même infectivité dans les deux lignées cellulaires (Figure 18).

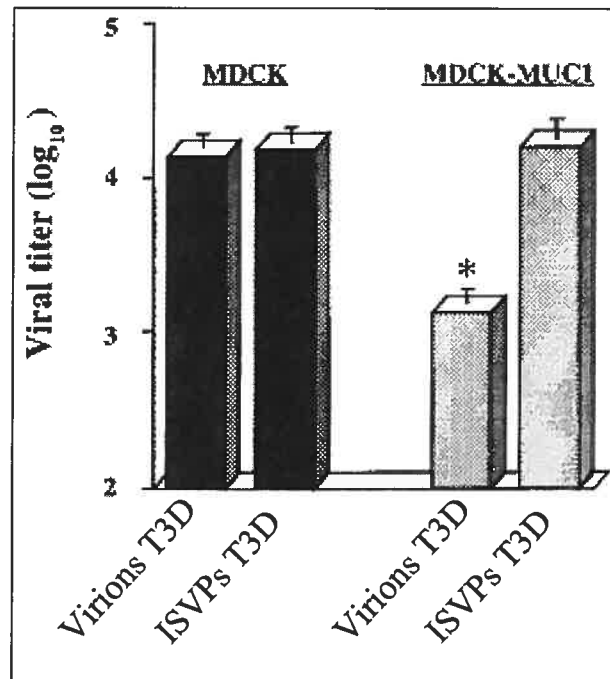


Figure 18. Effet d'une couche de mucine sur l'infectivité des virions et ISVPs. (adaptée de : Bisaillon, 1999).

Des cellules MDCK exprimant la mucine ou des cellules contrôles n'exprimant pas la mucine ont été utilisées pour déterminer le titre viral à l'aide de la méthode de la DICT50. Les virions et les ISVPs proviennent d'une même production virale. Les résultats présentés sont la moyenne de trois titrages indépendants. L'astérisque représente une valeur qui était significativement différente des autres mesures selon le t-test de Student.

Cette différence avait été attribuée à la présence du site catalytique $\sigma 1$ qui est démasqué chez les ISVPs. Un titrage des différents r-ISVPs a donc été effectué sur des cellules MDCK et MDCK-MUC1. Lors du premier essai, nous avons noté une différence d'environ 2,5 fois (0,4 log) en terme d'infectivité chez des ISVPs portant les protéines $\sigma 1$ E36D et E36Q alors que les ISVPs contenant la protéine $\sigma 1$ sauvage ne

démontre aucune diminution d'infectivité en présence de mucine (Figure 19). Ceci concorde avec le résultat de l'étude menée initialement (Figure 18). Par contre, l'infectivité des ISVPs ayant à leur surface la protéine $\sigma 1$ D54N semble presque identique dans les cellules MDCK et les cellules MDCK-MUC1 (Figure 19). Un deuxième essai a été mené cette fois-ci en comparant des virions et des ISVPs portant la protéine $\sigma 1$ sauvage ainsi que des virions et des ISVPs contenant la protéine $\sigma 1$ ayant la substitution d'acide aminé E36Q. Cette substitution d'acide aminé représente bien la perte d'activité enzymatique de $\sigma 1$ et correspond à l'acide aminé responsable de l'hydrolyse du lien glycoside entrant dans la formation de la mucine (**Bisaillon, 1999**). Ainsi, à la figure 20, il est possible de voir que les r-virions portant la protéine $\sigma 1$ sauvage ou la protéine $\sigma 1$ E36Q présente une infectivité réduite d'environ 3,5 à 6 fois en présence de mucine (une perte de 0,54 log pour le virion contenant $\sigma 1$ E36Q et une perte de 0,78 log pour le virion contenant $\sigma 1$ sauvage). Par contre, les ISVPs contenant la protéine $\sigma 1$ de type sauvage ne perdent aucunement leur infectivité; celle-ci semble même augmenter d'environ 2,5 fois (0,4 log) en présence de mucine alors que les ISVPs portant la protéine $\sigma 1$ E36Q ont une baisse d'infectivité de près de 8 fois (0,9 log).

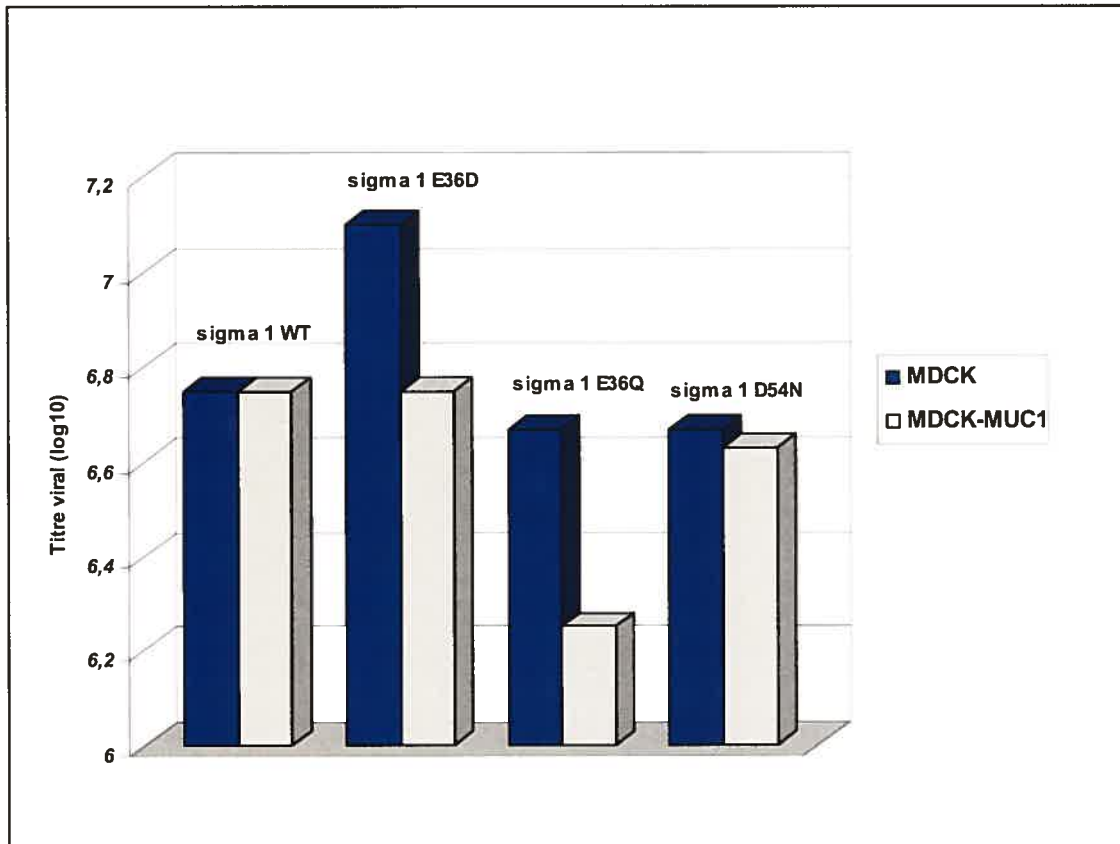


Figure 19. Effet d'une couche de mucine sur l'infektivité des r-ISVPs portant les différents mutants de $\sigma 1$.

Des cellules MDCK exprimant la mucine ou des cellules contrôles MDCK n'exprimant pas la mucine ont été utilisées pour déterminer le titre viral à l'aide de la méthode de la DICT₅₀. Les cores entrant dans la formation des ISVPs proviennent d'une même production virale. Les résultats présentés proviennent d'une seule mesure du titre viral.

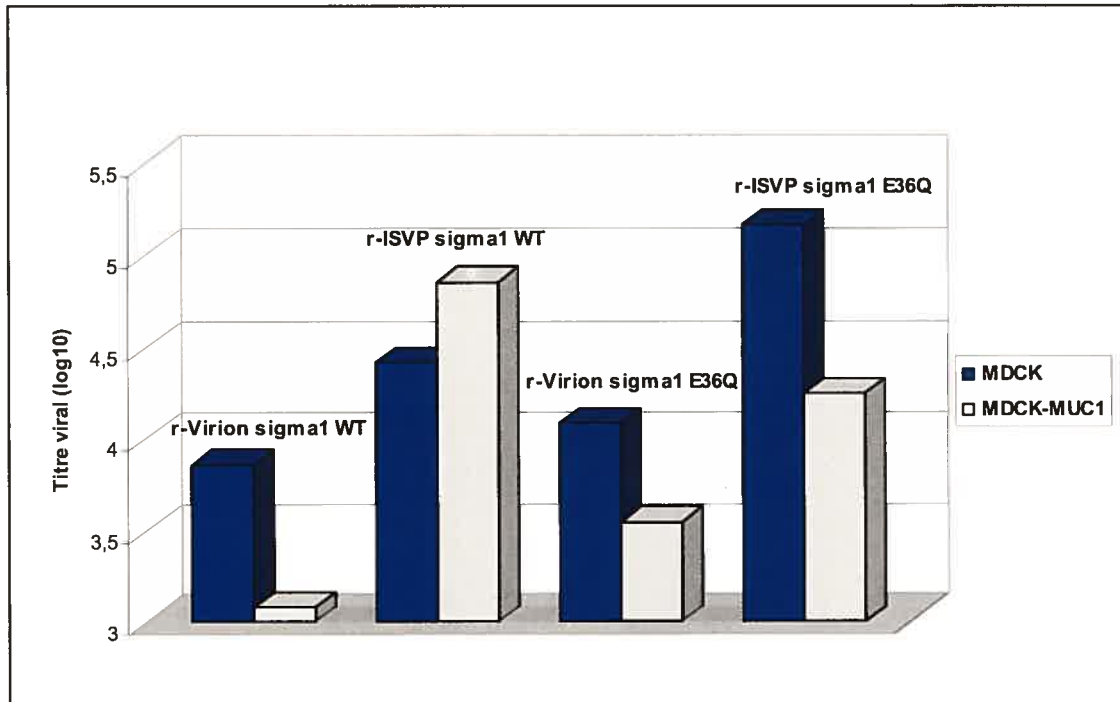


Figure 20. Effet d'une couche de mucine sur l'infectivité des r-Virions et r-ISVPs portant la protéine $\sigma 1$ de type sauvage ou contenant la substitution d'acide aminé E36Q.

Des cellules MDCK exprimant la mucine ou des cellules contrôles MDCK n'exprimant pas la mucine ont été utilisées pour déterminer le titre viral à l'aide de la méthode de la DICT50. Les *cores* entrant dans la formation des virions et des ISVPs proviennent d'une même production virale. Les résultats présentés proviennent d'une seule mesure du titre viral.

5. Discussion

5.1 Expression des protéines $\mu 1$, $\sigma 3$ et $\sigma 1$

L'expression des protéines recombinantes $\mu 1$, $\sigma 3$ et $\sigma 1$ de la capsid externe de réovirus a été rendue possible grâce à l'utilisation du système d'expression de protéines à partir du baculovirus. Le recours à un tel système était motivé par le fait que, d'une part ce système a servi dans les premières études de recapsidation *in vitro* (Chandran, 2001) et d'autre part par le fait que c'est un système eucaryote qui est reconnu pour exprimer de grandes quantités de protéines contrairement au système *Pichia pastoris* précédemment utilisé au laboratoire. De plus, cette méthode d'expression protéique est avantageuse car, étant un système eucaryote, nous nous assurons du bon repliement des protéines dû à l'action des chaperonnes tel que, par exemple, Hsp70 et Hsp90 qui entrent dans la trimérisation de $\sigma 1$. Dans les premières études de recapsidation (Chandran, 1999) les protéines $\mu 1$ et $\sigma 3$ semblent exprimées à de forts niveaux, puisqu'elles sont détectables par coloration au bleu de Coomassie et quantifiable par cette méthode. Toutefois, dans notre cas, nous ne pouvions détecter les protéines que par immunobuvardage. Une des raisons de cette faible expression par rapport aux études antérieures est qu'il était difficile de titrer notre préparation de baculovirus tel que décrit par le manufacturier. Ne pouvant pas titrer le virus nous ne pouvions pas savoir avec exactitude le volume de préparation virale à utiliser pour infecter les cellules d'insectes High Five à une MOI de 5 à 10 tel que suggéré. Par ailleurs, lors des premières études de recapsidation, l'expression des protéines recombinantes a été

effectuée avec de grandes quantités de cellules High Five en suspension alors que, dans notre cas, la production des protéines virales a été limitée à des pétris contenant dix millions de cellules totales. L'expression de la protéine $\mu 1$ est plus facilement détectable que la protéine $\sigma 3$. Bien que cette meilleure détection puisse être expliquée en partie par une meilleure reconnaissance de la protéine $\mu 1$ par l'anticorps utilisé, il est aussi connu que le promoteur sous lequel $\mu 1$ est contrôlé est beaucoup plus fort que le promoteur p10 qui contrôle la protéine $\sigma 3$ chez le baculovirus recombinant. L'utilité d'exprimer les deux protéines majeures de la capsid est d'une part de pouvoir former le complexe hétérotrimérique dans la cellule et permettre le clivage de $\mu 1$ à $\mu 1N$ et $\mu 1C$ (Lee, 1981), comme on peut le voir à la figure 11. Pour ce qui est des protéines $\sigma 1$, nous ne pouvions pas observer leur présence par coloration au bleu de Coomassie non plus et ainsi il était impossible de les quantifier. Un immunobuvardage n'a pu être effectué car l'anticorps reconnaissant la protéine d'attachement était un anticorps conformationnel. Il a donc fallu marquer les protéines recombinantes afin d'exécuter une immunoprécipitation (Figure 12). Une seule protéine radioactive a été détectée avec l'anticorps monoclonal utilisé dans chacun des essais et cette dernière avait un poids moléculaire identique à celui de la protéine $\sigma 1$ (Nibert, 2001) dans chacun des extraits protéiques. Maintenant que nous avons bien démontré la faisabilité d'étudier le site catalytique de $\sigma 1$ à l'aide de ces protéines, il serait sans doute intéressant de mieux optimiser le système pour la production des protéines en plus grandes quantités.

5.2 Recapsidation

Grâce à l'utilisation du système d'expression protéique eucaryote à baculovirus et grâce à la possibilité de former des *cores in vitro*, il est possible de remplacer chacune des trois protéines de la capsid externe et d'étudier l'effet de substitution d'acides aminés au sein de chacune de ces protéines sur l'infectivité du virus; en autant que ces substitutions n'altèrent en aucun cas la recapsidation de ces protéines. Il fallait donc nous assurer que non seulement nous pouvions reproduire les données de recapsidation avec la protéine $\sigma 1$ sauvage, mais que les substitutions d'acides aminés au site catalytique n'affectent pas l'incorporation des protéines sur la particule virale. La technique de recapsidation utilisée lors de notre étude est une version simplifiée de la méthode initialement publiée (Chandran, 1999). En effet, nous n'avons pas eu recours à un gradient de chlorure de césium pour purifier les particules recapsidées. Un simple coussin de chlorure de césium a servi à isoler les particules recapsidées des protéines solubles ne s'étant pas liées au virus. Par ailleurs, bien que la particule virale native ait une densité de $1,36 \text{ g/cm}^3$ (Nibert, 2001) et qu'en principe le virus peut passer au travers d'un coussin de $1,32 \text{ g/cm}^3$, nous n'avons pas eu le choix de diminuer la densité du coussin à $1,22 \text{ g/cm}^3$ pour optimiser la séparation des particules virales recapsidées des protéines en suspension. Pendant l'étape d'incubation à 37°C des *cores* avec les protéines recombinantes non purifiées produites dans les cellules d'insectes, il y a sans doute plusieurs autres protéines qui vont s'agglomérer autour de la particule virale de façon non spécifique et ainsi diminuer la densité du virus. Nous nous sommes par contre assuré que la recapsidation se déroule efficacement sans entraîner des

protéines du réovirus qui ne se sont pas liées aux cores (Figure 13). Il faut reconnaître cependant que l'efficacité de recapsidation n'est pas aussi optimale que dans l'étude de Chandran *et al.* qui affirme que les particules sont recapsidées de façon presque identique aux virions natifs. Si on considère qu'à la figure 13 la quantité de particules recapsidées est identique à la quantité de virions sauvages (non recapsidés, dans le premier puit), il est évident que certains *cores* recapsidés ne contiennent pas toutes les protéines recombinantes en quantité comparable au virion. Ceci s'explique sans doute en partie par le fait que la quantité des protéines exprimées à l'aide du système à baculovirus n'est pas optimale. De plus, l'efficacité de recapsidation peut varier d'une expérience à l'autre. Il est important de noter que lors de la recapsidation, les protéines ne vont pas se lier de façon aléatoire sur les particules. Des études dans notre laboratoire ont démontré, par microscopie électronique, que les protéines $\mu 1$ et $\sigma 3$ vont se lier préférentiellement sur des particules virales en cours de recapsidation (résultat non montré). Ainsi, les protéines virales vont d'abord compléter le recouvrement d'une particule virale avant de recapsider d'autres cores. Cette technique de recapsidation nous a donc permis de mesurer l'effet des substitutions d'acides aminés de $\sigma 1$ sur la capacité infectieuse des virions.

5.3 Effet des mutations sur la protéine $\sigma 1$

Une des questions importante lors du projet était de savoir si les mutations au niveau du site actif de la protéine d'attachement $\sigma 1$ avaient un effet négatif quelconque sur la production des protéines dans le système à baculovirus, d'une part, et d'autre

part, sur la stabilité et la structure de la protéine. De plus, il était essentiel que les substitutions d'acides aminés sur $\sigma 1$ n'aient aucun effet sur la trimérisation ou la recapsidation de cette protéine sur les cores débarassés de leur protéine $\sigma 1$ native. Bien qu'une étude sur l'activité enzymatique de $\sigma 1$ *in vitro* avait déjà été menée dans le laboratoire (Bisaillon, 1999) avec des protéines $\sigma 1$ arborant les substitutions d'acides aminés E36D, E36Q et D54N, nous ne pouvions pas avoir la conviction qu'il n'y avait aucun effet sur la structure globale de la protéine. Nous avons déterminé le profil d'hydrophobicité ainsi que le profil potentiel en hélices α et en feuillets β des différentes protéines $\sigma 1$ mutantes en comparaison avec la protéine $\sigma 1$ sauvage. Nous avons eu recours au programme informatique ProtScale de Expasy qui utilise les valeurs d'hydrophobie d'acides aminés de Kyte et Doolittle (Kyte, 1982) pour tracer les courbes d'hydrophobicité. Nous pouvons voir au haut de la figure 21 le profil d'hydrophobicité de la protéine $\sigma 1$ sauvage. Il y a un grand pic au tout début du tracé qui correspond probablement aux premiers acides aminés hydrophobes de $\sigma 1$ servant à l'ancrage de cette protéine au sein des particules virales. Si on analyse les tracés correspondant aux protéines $\sigma 1$ mutantes, on peut observer qu'il n'y a aucune modification notable quant à l'hydrophobicité de la protéine. Des analyses similaires ont été menées pour explorer des changements potentiels sur le profil d'hélices α et de feuillets β avec les protéines mutantes (Chou et Fasman, 1978). Ces analyses n'ont révélé aucun changement dans la structure secondaire des protéines modifiées. Bien que ces tracés soient des analyses statistiques et non des observations physiques de protéines mutantes par cristallographie, ils nous indiquent que très probablement les structures tertiaire et quaternaire de $\sigma 1$ ne sont pas affectées.

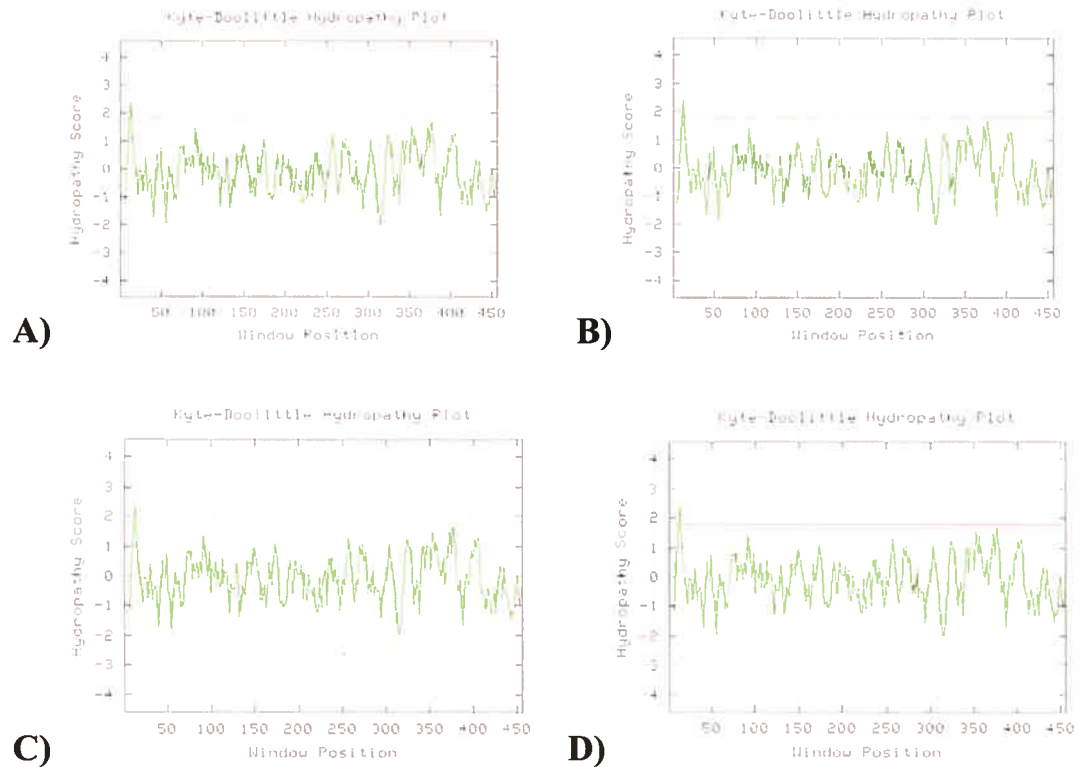


Figure 21. Profil d'hydrophobicité des protéines $\sigma 1$.

A) protéine sauvage; B) protéine E36D; C) protéine E36Q; D) protéine D54N.

Une première indication expérimentale qui suggère que les mutations au sein du site catalytique de $\sigma 1$ n'altèrent pas la conformation de cette protéine est qu'il a été possible d'observer les protéines mutantes de $\sigma 1$ avec un anticorps conformationnel lors de l'immunoprécipitation et l'intensité des bandes correspondant aux protéines mutantes était identique à l'intensité de la bande correspondant à la protéine $\sigma 1$ sauvage (Figure 12). Par ailleurs, les mutations auraient pu causer une incapacité de la protéine $\sigma 1$ à former des trimères. Cette hypothèse peut aussi être écarté grâce à l'observation de complexes trimériques de $\sigma 1$ mutants sur des gels de protéines non dénaturant (Bisailon, 1999). D'autre part, bien que l'on suppose que de simples monomères de $\sigma 1$

puissent se lier sur le récepteur cellulaire JAM1 (Chappell, 2002), la protéine $\sigma 1$ ne peut se lier aux particules virales que sous sa forme trimérique (Strong, 1991). Puisque les particules recapsidées retrouvent leur infectivité en présence de $\sigma 1$, ceci suggère, de façon indirecte, que $\sigma 1$ est bien incorporé aux virions et de ce fait qu'elle est sous forme trimérique (Figure 14).

5.4 Infectivité des particules recapsidées sur les cellules L929

Le test d'infectivité initial sur les cellules fibroblastiques L929 a révélé que les particules recapsidées retrouvaient en partie leur caractère infectieux (Figure 14) malgré une légère différence entre les particules contenant les mutations E36D et E36Q au niveau du site catalytique de $\sigma 1$ (Figure 16); effet qui peut être attribuable à la variabilité de l'efficacité de recapsidation ou à une plus faible présence de ces protéines mutantes lors de la recapsidation. Comme mentionné plus haut, on note une légère augmentation de l'infectivité des particules lorsqu'on rajoute les protéines $\mu 1$ et $\sigma 3$ dans la préparation de cores. Cet effet observé est probablement dû à l'action de la protéine $\mu 1$ qui permet au virus de pénétrer au travers des membranes biologiques (Nibert, 2005). Il est évident que lors d'une infection normale, de telles particules ne possédant pas de protéines d'attachement ne pourraient pas initier un cycle de réplication. Pourtant, dans des essais cellulaires *in vitro*, lorsque la quantité de virus est considérable, même des virus ne possédant pas de protéine d'attachement peuvent probablement se lier par des interactions faibles avec les cellules et infecter ces dernières. Il a été observé que les particules virales ne retrouvaient pas leur infectivité

native et la raison mentionnée a été celle de la faible expression de protéines dans le système d'expression à baculovirus. Nous avons signalé que, dans le cas des protéines $\mu 1$ et $\sigma 3$, l'association des ces protéines sur les *cores* se fait probablement sur des particules en cours de recapsidation. Dans le cas de la protéine $\sigma 1$, nous n'avons aucune idée du processus ou de l'ordre précis dans lequel sa recapsidation se déroule. Chose certaine, il est connu qu'un minimum de trois trimère doit se retrouver sur chacune des particules pour qu'elles retrouvent leur infectivité (Strong, 1991). Par ailleurs, certains détergents utilisés lors de l'extraction des protéines recombinantes pourraient inhiber partiellement l'incorporation de certaines protéines et ainsi diminuer l'infectivité des particules virales.

5.5 Infectivité des particules recapsidées sur les cellules Caco-2

Au moment d'étudier l'activité mucinolytique de particules portant les protéines $\sigma 1$ de réovirus, nous avons en culture au laboratoire des cellules Caco-2 qui sont des cellules provenant d'une lignée cancéreuse de l'intestin. L'idée d'utiliser ces cellules résidait dans le fait que, tout comme les cellules épithéliales entrant dans la formation de l'épithélium intestinal, les cellules Caco-2 expriment à leur surface plusieurs mucines transmembranaires ainsi que des mucines solubles (van Klinken, 1996). Il était donc intéressant d'avoir recours à cette lignée pour imiter en quelque sorte l'infection naturelle de réovirus chez son hôte animal. En effet, cette lignée cellulaire exprime à sa surface les types de mucine MUC1, MUC3, MUC4 ET MUC5A/C retrouvées abondamment au niveau de l'intestin. De plus, l'expression de la mucine

MUC3 est dépendante de la différenciation cellulaire de Caco-2 *in vitro*. Il a été rapporté que la différenciation cellulaire de Caco-2 se fait de façon aléatoire lorsque ces cellules sont cultivées en laboratoire. Puisque l'expression de certaines mucines est dépendante de la différenciation cellulaire, il y a certains endroits dans le pétri où des cellules n'ont pas de mucines à leur surface ou ont moins de mucines que d'autres cellules. Ceci explique sans doute pourquoi tous les ISVPs, contenant la protéine $\sigma 1$ sauvage ou les différentes protéines $\sigma 1$ mutantes, avaient la même infectivité dans cette expérience (Figure 17). Un phénomène intéressant qui a été observé est que seuls les ISVPs semblent infectieux dans cette lignée cellulaire. Puisque après l'adsorption du virus sur les cellules Caco-2 les virus non adsorbés ont été enlevés par lavage, on peut tout de suite supposer que la raison de cette meilleure infectivité réside dans le fait que les ISVPs se sont mieux liés que les virions. Dans ce cas, une meilleure liaison est possiblement causée par la présence du site de liaison à l'acide sialique qui est démasqué chez les ISVPs. Il serait intéressant d'explorer ce phénomène en relation avec le caractère oncolytique du réovirus puisque les cellules Caco-2 sont des cellules cancéreuses.

5.6 Infectivité des particules recapsidées sur les cellules MDCK-MUC1

Suite à la difficulté d'interpréter les résultats obtenus avec les cellules Caco-2, nous sommes retournés au système cellulaire MDCK utilisé lors de la première étude de l'activité mucinolytique de $\sigma 1$ (Bisaillon, 1999). L'avantage de l'utilisation de cette lignée est que nous avons en notre possession un contrôle de cellules qui n'exprimaient

pas de mucines à leur surface et ainsi nous pouvions comparer l'effet de la mucine sur l'infectivité des particules portant à leur surface les différentes protéines mutantes de $\sigma 1$. L'étude initiale de l'infectivité des virions et des ISVPs en présence de mucine a révélé qu'il y avait une diminution d'infectivité de près de dix fois dans le cas des virions sur les cellules exprimant la mucine transmembranaire de type 1 (Figure 19). Par contre, dans le cas des ISVPs, on observe une légère augmentation de l'infectivité. Mis à part le fait que l'activité mucinolytique et la liaison à l'acide sialique sont démasquées chez l'ISVP, ce phénomène d'une légère augmentation du caractère infectieux de ces particules est aussi observé en temps normal sur des cellules utilisées de routine en laboratoire.

Une perte d'infectivité de l'ordre de dix fois est considérable, surtout si nous prenons en compte le fait que chez l'hôte naturel la couche de mucine recouvrant l'épithélium intestinal est formée de plusieurs types de mucines et que cette couche est probablement plus épaisse que dans notre essai *in vitro*. Ainsi, la différence d'infectivité en présence de mucine pourrait potentiellement être plus importante entre les virions et les ISVPs chez l'animal. Pour ce qui en est de nos données sur l'infectivité des particules virales recapsidées, nous notons une baisse d'infectivité d'environ 2,5 fois lors du premier essai (Figure 20) avec les particules portant les protéines $\sigma 1$ E36D et E36Q. Ce résultat est intéressant car nous ciblons spécifiquement l'activité mucinolytique chez $\sigma 1$. En effet, nous avons mentionné que chez les ISVPs deux caractéristiques de $\sigma 1$ sont révélées, d'une part l'activité mucinolytique qui réside dans la partie N-terminale de la protéine et d'autre part la liaison à l'acide sialique qui

est augmenté chez ces particules. Or, la meilleure infectivité des ISVPs sur des cellules MDCK-MUC1 en comparaison avec les virions aurait pu être le résultat de ces deux propriétés de $\sigma 1$. Le résultat obtenu indique que le phénomène dépend vraiment de l'activité mucinolytique via le site d'homologie aux lysozymes. Par ailleurs, nous n'observons pas de changements considérables dans l'infectivité des particules portant la protéine $\sigma 1$ D54N. Ceci est conforme avec ce que nous nous attendions d'observer. Il a été mentionné que le changement de l'acide aspartique en position 54 par une asparagine diminuait l'affinité de $\sigma 1$ pour son substrat sans toutefois affecter l'activité enzymatique qui est attribuable à l'acide glutamique en position 36 de la protéine d'attachement. Il est important de mentionner, par contre, que les résultats varient d'un essai à l'autre sans doute dû à des différences d'efficacité dans la réaction de recapsidation. Lors du deuxième essai, nous avons obtenus des résultats similaires aux résultats obtenus lors de l'étude initiale de l'activité mucinolytique avec les virions et les ISVPs recapsidés par la protéine $\sigma 1$ sauvage (Figure 20). Des données semblables ont été obtenues avec les virions et les ISVPs contenant la protéine $\sigma 1$ E36Q quoique la perte d'infectivité n'atteint pas le niveau obtenu avec les virions et les ISVPs natifs. Si on considère que les ISVPs ayant à leur surface les protéines mutantes $\sigma 1$ E36D et E36Q perdent légèrement leur infectivité dans les cellules MDCK-mucine, l'observation chez les cellules Caco-2 de l'infectivité identique d'un ISVP à l'autre est compréhensible puisqu'une perte d'infectivité de deux fois n'occasionerait pas de grandes différences dans la détection de protéines virales lors d'un immunobuvardage.

Bien que dans quelques cas la perte d'infectivité est de l'ordre de 2,5 fois, si on regarde ce phénomène en terme de sélection naturelle, à force d'infection répétée chez l'animal, seules les particules possédant une activité mucinolytique seront avantagées à long terme. Par ailleurs, si on convertit les données logarithmiques obtenues en terme de pourcentage d'infectivité, il est possible de calculer une diminution d'infectivité de près de 85% pour des ISVPs ayant à leur surface la protéine E36Q en présence de mucine ce qui est non négligeable. Si on considère que le site catalytique se retrouve presque à l'extrémité N-terminale de la protéine et donc se retrouve à proximité du virion c'est à se demander comment la dégradation de la couche de mucine par la particule virale est concrètement possible. Comme on l'a vu, la protéine $\sigma 1$ est extrêmement longue et c'est une protéine qui est très flexible. Probablement que la protéine $\sigma 1$ chez l'ISVP, une fois relâchée, se retrouve courbée d'une manière positionnant le site actif de $\sigma 1$ devant la particule virale. Ceci permettrait à cette dernière de digérer la couche de mucine, rendant accessible par le fait même les cellules permissives à l'infection du virus.

5.7 Perspectives

Lors d'expériences futures, il sera nécessaire tout d'abord d'effectuer plusieurs autres titrages de particules recapsidées avec les différents mutants de $\sigma 1$ pour établir une corrélation statistique et arriver avec une mesure plus précise de la perte d'infectivité. Il sera intéressant aussi d'étudier plus en détail la contribution de l'activité mucinolytique et la contribution de la liaison à l'acide sialique individuellement ou de

façon synergique dans la meilleure infectivité des ISVPs. Puisque le titrage sur les cellules MDCK et MDCK-mucine se déroule pendant cinq jours, plusieurs phénomènes peuvent permettre l'infectivité des particules mutantes. Par exemple, la mort de certaines cellules lors de ces cinq jours d'incubation peut laisser ainsi passer les virus au travers de la couche cellulaire. Ceci peut interférer avec les données attendues. Il sera donc nécessaire d'effectuer prochainement un test d'infectivité avec les particules recapsidées dans un essai se déroulant sur une période de 24 heures, utilisant l'immunofluorescence sur des cellules infectées pour déterminer précisément le nombre de particule pouvant initier un cycle de réplication en présence ou en absence de mucine. Par ailleurs, il sera nécessaire d'explorer le rôle potentiel des détergents utilisés lors de l'extraction des protéines recombinantes dans l'inhibition de la recapsidation de certaines protéines. Il faudra aussi explorer la perte d'infectivité des particules ayant perdu leur activité mucinolytique chez l'animal. Pour ce faire, il sera aussi nécessaire d'optimiser l'expression des protéines recombinantes avec le système à baculovirus, sûrement en améliorant le titrage de ce virus et en passant dans des cultures de cellules d'insecte en suspension. Une meilleure méthode de purification des particules recapsidées devra être établie pour se débarrasser de tous contaminants cellulaires qui pourraient interférer avec nos essais. Bien entendu, l'idéal serait d'avoir un système de génétique inverse convenable pour générer des particules virales contenant dans leur génome les mutations étudiées lors de cette étude. L'absence d'un système adéquat pour ce faire demeure un obstacle important dans l'étude des réovirus et des virus apparentés. Par ailleurs l'activité mucinolytique pourrait être explorée sur des lignées de cellules cancéreuses surexprimant la mucine de type 1, cette dernière étant connu

pour être responsable, entre autres, de l'attachement de cellules tumorales à d'autres sites chez l'animal rendant ainsi les cellules métastatiques (McDermott, 2001). De plus, il sera fascinant de comparer l'activité mucinolytique, étudiée chez le réovirus de sérotype T3D, avec les réovirus des autres sérotypes majeurs soit le réovirus T1L et T2J en relation avec le site d'infection initiale chez l'hôte naturel. De façon plus large, le système de recapsidation pourrait permettre d'étudier le rôle d'autres acides aminés dans la biologie de $\sigma 1$.

5.8 Conclusions

En conclusion, nous pouvons affirmer que les mutations au sein du site actif de $\sigma 1$ n'altèrent pas la stabilité ou la conformation de cette protéine. Ces mutations ne modifient pas non plus la trimérisation puisque il a été possible dans des études antérieures d'observer la formation de complexes trimériques de $\sigma 1$ arborant les mutations E36D, E36Q et D54N. De plus, ces protéines mutantes peuvent se recapsider sur des *cores* et permettre aux particules virales d'être infectieuses dans des cellules fibroblastiques de souris L929. Les mutants de $\sigma 1$ E36D et E36Q diminuent l'infectivité des ISVPs sur des cellules MDCK exprimant la mucine de type 1 à sa surface. Ces résultats confirment, dans le contexte d'une particule virale infectieuse, que la protéine $\sigma 1$ de réovirus T3D possède bien une activité mucinolytique dépendante de la région d'homologie aux lysozymes de type C et que cette activité permet à la particule virale de franchir la couche de mucine recouvrant certaines cellules pour faciliter ainsi l'initiation du cycle de réplication viral.

Références

- Acs G, Klett H, Schonberg M, Christman J, Levin DH, Silverstein SC.** (1971). Mechanism of reovirus double-stranded ribonucleic acid synthesis in vivo and in vitro. *J Virol* 8, 684-689.
- Alain T, Hirasawa K, Pon KJ, Nishikawa SG, Urbanski SJ, Auer Y, Luider J, Martin A, Johnston RN, Janowska-Wieczorek A, Lee PW, Kossakowska AE.** (2002). Reovirus therapy of lymphoid malignancies. *Blood* 100, 4146-4153.
- Amerongen HM, Wilson GA, Fields BN, Neutra MR.** (1994). Proteolytic processing of reovirus is required for adherence to intestinal M cells. *J Virol* 68, 8428-8432.
- Antczak JB, Chmelo R, Pickup DJ, Joklik WK.** (1982). Sequence at both termini of the 10 genes of reovirus serotype 3 (strain Dearing). *Virology* 121, 307-319.
- Antczak JB, Joklik WK.** (1992). Reovirus genome segment assortment into progeny genomes studied by the use of monoclonal antibodies directed against reovirus proteins. *Virology* 187, 760-776.
- Armstrong GD, Paul RW, Lee PW.** (1984). Studies on reovirus receptors of L cells: virus binding characteristics and comparison with reovirus receptors of erythrocytes. *Virology* 138, 37-48.
- Arnott S, Wilkins MH, Fuller W, Langridge R.** (1967). Molecular and crystal structures of double-helical RNA. II. Determination and comparison of diffracted intensities from the alpha and beta crystalline forms of reovirus RNA and their interpretations in terms of groups of three RNA molecules. *J Mol Biol* 27, 525-533.

Attoui H, Biagini P, Stirling J, Mertens PP, Cantaloube JF, Meyer A, de Micco P, de Lamballerie X. (2001). Sequence characterization of Ndelle virus genome segments 1, 5, 7, 8, and 10: evidence for reassignment to the genus Orthoreovirus, family Reoviridae. *Biochem Biophys Res Commun* 287, 583-588.

Azzam-Smoak K, Noah DL, Stewart MJ, Blum MA, Sherry B. (2002). Interferon regulatory factor-1, interferon-beta, and reovirus-induced myocarditis. *Virology* 298, 20-29.

Baer GS, Ebert DH, Chung CJ, Erickson AH, Dermody TS. (1999). Mutant cells selected during persistent reovirus infection do not express mature cathepsin L and do not support reovirus disassembly. *J Virol* 73, 9532-9543.

Banerjee AK, Shatkin AJ. (1970). Transcription in vitro by reovirus-associated ribonucleic acid-dependent polymerase. *J Virol* 6, 1-11.

Bangaru B, Morecki R, Glaser JH, Gartner LM, Horwitz MS. (1980). Comparative studies of biliary atresia in the human newborn and reovirus-induced cholangitis in weanling mice. *Lab Invest* 43, 456-462.

Bartlett NM, Gillies SC, Bullivant S, Bellamy AR. (1974). Electron microscopy study of reovirus reaction cores. *J Virol* 14, 315-326.

Barton ES, Forrest JC, Connolly JL, Chappell JD, Liu Y, Schnell FJ, Nusrat A, Parkos CA, Dermody TS. (2001). Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus. *Cell* 104, 441-451.

Barton ES, Youree BE, Ebert DH, Forrest JC, Connolly JL, Valyi-Nagy T, Washington K, Wetzel JD, Dermody TS. (2003). Utilization of sialic acid as a

coreceptor is required for reovirus-induced biliary disease. *J Clin Invest* *111*, 1823-1833.

Bass DM, Bodkin D, Dambrauskas R, Trier JS, Fields BN, Wolf JL. (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.

Bassel-Duby R, Nibert ML, Homcy CJ, Fields BN, Sawutz DG. (1987). Evidence that the sigma 1 protein of reovirus serotype 3 is a multimer. *J Virol* *61*, 1834-1841.

Bassel-Duby R, Spriggs DR, Tyler KL, Fields BN. (1986). Identification of attenuating mutations on the reovirus type 3 S1 double-stranded RNA segment with a rapid sequencing technique. *J Virol* *60*, 64-67.

Bellamy AR, Shapiro L, August JT, Joklik WK. (1967). Studies on reovirus RNA. I. Characterization of reovirus genome RNA. *J Mol Biol* *29*, 1-17.

Bisaillon M, Bergeron J, Lemay G. (1997). (A). Characterization of the nucleoside triphosphate phosphohydrolase and helicase activities of the reovirus lambda1 protein. *J Biol Chem* *272*, 18298-18303.

Bisaillon M, Lemay G. (1997). (B). Characterization of the reovirus lambda1 protein RNA 5'-triphosphatase activity. *J Biol Chem* *272*, 29954-29957.

Bisaillon M, Senechal S, Bernier L, Lemay G. (1999). A glycosyl hydrolase activity of mammalian reovirus sigma1 protein can contribute to viral infection through a mucus layer. *J Mol Biol* *286*, 759-773.

Bodkin DK, Nibert ML, Fields BN. (1989). Proteolytic digestion of reovirus in the intestinal lumens of neonatal mice. *J Virol* *63*, 4676-4681.

- Borsa J, Copps TP, Sargent MD.** (1973). New intermediate subviral particles in the in vitro uncoating of reovirus virions by chymotrypsin. *J Virol* 11, 552-564.
- Borsa J, Long DG, Sargent MD, Copps TP, Chapman JD.** (1974). Reovirus transcriptase activation in vitro: involvement of an endogenous uncoating activity in the second stage of the process. *Intervirology* 4, 171-188.
- Borsa J, Morash BD, Sargent MD, Copps TP, Lievaart PA, Szekely JG.** (1979). Two modes of entry of reovirus particles into L cells. *J Gen Virol* 45, 161-170.
- Brentano L, Noah DL, Brown EG, Sherry B.** (1998). The reovirus protein mu2, encoded by the M1 gene, is an RNA-binding protein. *J Virol* 72, 8354-8357.
- Canning WM, Fields BN.** (1983). Ammonium chloride prevents lytic growth of reovirus and helps to establish persistent infection in mouse L cells. *Science* 219, 987-988.
- Cashdollar LW.** (1994). Characterization and structural localization of the reovirus lambda 3 protein. *Res Virol* 145, 277-285.
- Chandran K, Farsetta DL, Nibert ML.** (2002). Strategy for nonenveloped virus entry: a hydrophobic conformer of the reovirus membrane penetration protein micro 1 mediates membrane disruption. *J Virol* 76, 9920-9933.
- Chandran K, Parker JS, Ehrlich M, Kirchhausen T, Nibert ML.** (2003). The delta region of outer-capsid protein micro 1 undergoes conformational change and release from reovirus particles during cell entry. *J Virol* 77, 13361-13375.
- Chandran K, Walker SB, Chen Y, Contreras CM, Schiff LA, Baker TS, Nibert ML.** (1999). In vitro recoating of reovirus cores with baculovirus-expressed outer-capsid proteins mu1 and sigma3. *J Virol* 73, 3941-3950.

Chandran K, Zhang X, Olson NH, Walker SB, Chappell JD, Dermody TS, Baker TS, Nibert ML. (2001). Complete in vitro assembly of the reovirus outer capsid produces highly infectious particles suitable for genetic studies of the receptor-binding protein. *J Virol* 75, 5335-5342.

Chappell JD, Barton ES, Smith TH, Baer GS, Duong DT, Nibert ML, Dermody TS. (1998). Cleavage susceptibility of reovirus attachment protein $\sigma 1$ during proteolytic disassembly of virions is determined by a sequence polymorphism in the sigma1 neck. *J Virol* 72, 8205-8213.

Chappell JD, Duong JL, Wright BW, Dermody TS. (2000). Identification of carbohydrate-binding domains in the attachment proteins of type 1 and type 3 reoviruses. *J Virol* 74, 8472-8479.

Chappell JD, Prota AE, Dermody TS, Stehle T. (2002). Crystal structure of reovirus attachment protein sigma1 reveals evolutionary relationship to adenovirus fiber. *EMBO J* 21, 1-11.

Chou PY, Fasman GD. (1978). Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 47, 145-148.

Clarke P, Meintzer SM, Gibson S, Widmann C, Garrington TP, Johnson GL, Tyler KL. (2000). Reovirus-induced apoptosis is mediated by TRAIL. *J Virol* 74, 8135-8139.

Clarke P, Meintzer SM, Spalding AC, Johnson GL, Tyler KL. (2001). Caspase 8-dependent sensitization of cancer cells to TRAIL-induced apoptosis following reovirus-infection. *Oncogene* 20, 6910-6919.

- Clarke P, Meintzer SM, Widmann C, Johnson GL, Tyler KL.** (2001). Reovirus infection activates JNK and the JNK-dependent transcription factor c-Jun. *J Virol* 75, 11275-11283.
- Cleveland DR, Zarbl H, Millward S.** (1986). Reovirus guanylyltransferase is L2 gene product lambda 2. *J Virol* 60, 307-311.
- Coffey MC, Strong JE, Forsyth PA, Lee PW.** (1998). Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway. *Science* 282, 1332-1334.
- Connolly JL, Barton ES, Dermody TS.** (2001). Reovirus binding to cell surface sialic acid potentiates virus-induced apoptosis. *J Virol* 75, 4029-4039.
- Connolly JL, Rodgers SE, Clarke P, Ballard DW, Kerr LD, Tyler KL, Dermody TS.** (2000). Reovirus-induced apoptosis requires activation of transcription factor NF-kappaB. *J Virol* 74, 2981-2989.
- Coombs KM.** (1998). Stoichiometry of reovirus structural proteins in virus, ISVP, and core particles. *Virology* 243, 218-228.
- Cross RK, Fields BN.** (1972). Temperature-sensitive mutants of reovirus type 3: studies on the synthesis of viral RNA. *Virology* 50, 799-809.
- Del Maschio A, De Luigi A, Martin-Padura T, Brockhaus M, Bartfai T, Fruscella P, Adorini L, Martino G, Furlan R, De Simoni MG, Dejana E.** (1999). Leukocyte recruitment in the cerebrospinal fluid of mice with experimental meningitis is inhibited by an antibody to junctional adhesion molecule (JAM). *J Exp Med* 190, 1351-1356.
- Dermody TS, Nibert ML, Bassel-Duby R, Fields BN.** (1990). A sigma 1 region important for hemagglutination by serotype 3 reovirus strains. *J Virol* 64, 5173-5176.

Derrien M, Hooper JW, Fields BN. (2003). The M2 gene segment is involved in the capacity of reovirus type 3Abney to induce the oily fur syndrome in neonatal mice, a S1 gene segment-associated phenotype. *Virology* 305, 25-30.

Drayna D, Fields BN. (1982). Activation and characterization of the reovirus transcriptase: genetic analysis. *J Virol* 41, 110-118.

Dryden KA, Wang G, Yeager M, Nibert ML, Coombs KM, Furlong DB, Fields BN, Baker TS. (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.

Ehrlich M, Boll W, Van Oijen A, Hariharan R, Chandran K, Nibert ML, Kirchhausen T. (2004). Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits. *Cell* 118, 591-605.

Epstein RL, Powers ML, Rogart RB, Weiner HL. (1984). Binding of 125I-labeled reovirus to cell surface receptors. *Virology* 133, 46-55.

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

Etoh T, Himeno Y, Matsumoto T, Aramaki M, Kawano K, Nishizono A, Kitano S. (2003). Oncolytic viral therapy for human pancreatic cancer cells by reovirus. *Clin Cancer Res* 9, 1218-1223.

Fajardo E, Shatkin AJ. (1990). Expression of the two reovirus S1 gene products in transfected mammalian cells. *Virology* 178, 223-231.

Fernandes J, Tang D, Leone G, Lee PW. (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.

Flint SJ, Enquist LW, Krug RM, Racaniello VR, Skalka AM. (2000). Principles of virology; molecular biology, pathogenesis, and control. ASM Press, Washington, 804 p.

Fraser RBD, Furlong DB, Trus BL, Nibert ML, Fields BN, Steven AC. (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.

Forrest JC, Dermody T S. (2003). Reovirus receptors and pathogenesis. *J Virol* 77, 9109-9115.

Fukutomi T, Sanekata T, Akashi H. (1996). Isolation of reovirus type 2 from diarrheal feces of pig. *J Vet Med Sci* 58, 555-557.

Furuichi Y, LaFiandra A, Shatkin AJ. (1974). 5'-Terminal structure and mRNA stability. *Nature* 266, 235-239.

Furuichi Y, Muthurkrishman S, Shatkin AJ. (1975). 5'-Terminal m-7G(5') ppp(5')G-m-p *in vivo*: identification in reovirus genome RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 72, 742-745.

Gentsch JR, Hatfield JW. (1984). Saturable attachment sites for type 3 mammalian reovirus on murine L cells and human HeLa cells. *Virus Res* 1, 401-414.

Georgi A, Mottola-Hartshorn C, Warner A, Fields B, Chen LB. (1990). Detection of individual fluorescently labeled reovirions in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6579-6583.

Gilmore R, Coffey MC, Lee PW. (1998). Active participation of Hsp90 in the biogenesis of the trimeric reovirus cell attachment protein $\sigma 1$. *J Biol Chem* 273, 15227-15233.

Giordano MO, Martinez LC, Isa MB, Ferreyra LJ, Canna F, Pavan JV, Paez M, Notario R, Nates SV. (2002). Twenty year study of the occurrence of reovirus infection in hospitalized children with acute gastroenteritis in Argentina. *Pediatr Infect Dis J* 21, 880-882.

Glaser JH, Balistreri WF, Morecki R. (1984). Role of reovirus type 3 in persistent infantile cholestasis. *J Pediatr* 105, 912-915.

Gomatos PJ, Tamm I. (1963). Macromolecular synthesis in reovirus-infected L cells. *Biochim Biophys Acta* 72, 651-653.

Gomatos PJ, Tamm I. (1963). The secondary structure of reovirus RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 49, 707-714.

Gomatos PJ, Stoeckenius W. (1964). Electron microscope studies on reovirus RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 52, 1449-1455.

Helander A, Silvey KJ, Mantis NJ, Hutchings AB, Chandran K, Lucas WT, Nibert ML, Neutra MR. (2003). The viral sigma1 protein and glycoconjugates containing alpha2-3-linked sialic acid are involved in type 1 reovirus adherence to M cell apical surfaces. *J Virol* 77, 7964-7977.

Hermann L, Embree J, Hazelton P, Wells B, Coombs RT. (2004). Reovirus type 2 isolated from cerebrospinal fluid. *Pediatr Infect Dis J* 23, 373-375.

Hirasawa K, Nishikawa SG, Norman KL, Alain T, Kossakowska A, Lee PW. (2002). Oncolytic reovirus against ovarian and colon cancer. *Cancer Res* 62, 1696-1701.

Hirasawa K, Nishikawa SG, Norman KL, Coffey MC, Thompson BG, Yoon CS, Waisman DM, Lee PW. (2003). Systemic reovirus therapy of metastatic cancer in immune-competent mice. *Cancer Res* 63, 348-353.

Hooper JW, Fields BN. (1996). Role of the mu 1 protein in reovirus stability and capacity to cause chromium release from host cells. *J Virol* 70, 459-467.

Huisman H, Joklik WK. (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, Jacobs BL. (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.

Ito Y, Joklik WK. (1972). Temperature-sensitive mutants of reovirus. I. Patterns of gene expression by mutants of groups C, D, and E. *Virology* 50, 189-201.

Jane-Valbuena J, Nibert ML, Spencer SM, Walker SB, Baker TS, Chen Y, Centonze VE, Schiff LA. (1999). Reovirus virion-like particles obtained by recoating infectious subvirion particles with baculovirus-expressed sigma3 protein: an approach for analyzing sigma3 functions during virus entry. *J Virol* 73, 2963-2973.

- Johanson PJ, Sveger T, Ahlfors K.** (1996). Reovirus type 1 associated with meningitis. *Scand J Infect Dis* 28, 117-120.
- Joklik WK.** (1972). Studies on the effect of chymotrypsin on reovirions. *Virology* 49, 700-715.
- Joklik WK, Roner MR.** (1995). What reassorts when reovirus genome segments reassort? *J Biol Chem* 270, 4181-4184.
- Kahn E.** (2004). Biliary atresia revisited. *Pediatr Dev Pathol* 7, 109-124.
- Kavenoff R, Talcove D, Mudd JA.** (1975). Genome-sized RNA from reovirus particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 72, 4317-4321.
- Kilani RT, Tamimi Y, Hanel EG, Wong KK, Karmali S, Lee PW, Moore RB.** (2003). Selective reovirus killing of bladder cancer in a co-culture spheroid model. *Virus Res* 93, 1-12.
- Kokubu T, Takahashi T, Takamura K.** (1993). Isolation of reovirus type 3 from dogs with diarrhea. *J Vet Med Sci* 55, 453-454.
- Kyte J, Doolittle RF.** (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol* 157, 105-132.
- Lau RY, Van Alstyne D, Berckmans R, Graham AF.** (1975). Synthesis of reovirus-specific polypeptides in cells pretreated with cycloheximide. *J Virol* 16, 470-478.
- Lee PW, Hayes EC, Joklik WK.** (1981). Protein $\sigma 1$ is the reovirus cell attachment protein. *Virology* 108, 156-163.
- Leone G, Mah DC, Lee PW.** (1991). The incorporation of reovirus cell attachment protein sigma 1 into virions requires the N-terminal hydrophobic tail and the adjacent heptad repeat region. *Virology* 182, 346-350.

Leone G, Maybaum L, Lee PW. (1992). The reovirus cell attachment protein possesses two independently active trimerization domains: basis of dominant negative effects. *Cell* 71, 479-488.

Leone G, Coffey MC, Gilmore R, Duncan R, Maybaum L, Lee PW. (1996). C-terminal trimerization, but not N-terminal trimerization, of the reovirus cell attachment protein is a posttranslational and Hsp70/ATP-dependent process. *J Biol Chem* 271, 8466-8471.

Liu Y, Nusrat A, Schnell FJ, Reaves TA, Walsh S, Pochet M, Parkos CA. (2000). Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J Cell Sci* 113, 2363-2374.

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

Luongo CL, Contreras CM, Farsetta DL, Nibert ML. (1998). Binding site for S-adenosyl-L-methionine in a central region of mammalian reovirus lambda2 protein. Evidence for activities in mRNA cap methylation. *J Biol Chem* 273, 23773-23780.

Luongo CL, Reinisch KM, Harrison SC, Nibert ML. (2000). Identification of the guanylyltransferase region and active site in reovirus mRNA capping protein lambda2. *J Biol Chem* 275, 2804-2810.

Mandell KJ, McCall IC, Parkos CA. (2004). Involvement of the junctional adhesion molecule-1 (JAM1) homodimer interface in regulation of epithelial barrier function. *J Biol Chem* 279, 16254-16262.

Mann MA, Knipe DM, Fischbach GD, Fields BN. (2002). Type 3 reovirus neuroinvasion after intramuscular inoculation: direct invasion of nerve terminals and age-dependent pathogenesis. *Virology* 303, 222-231.

Mann MA, Tyler KL, Knipe DM, Fields BN. (2002). Type 3 reovirus neuroinvasion after intramuscular inoculation: viral genetic determinants of lethality and spinal cord infection. *Virology* 303, 213-221.

Mantle M, Basaraba L, Peacock SC, Gall DG. (1989). Binding of *Yersinia enterocolitica* to rabbit intestinal brush border membranes, mucus, and mucin. *Infect Immun* 57, 3292-3299.

Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E. (1998) Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 142, 117-127.

Matsumura I, Kirsch JF. (1996). Synergistic contributions of asparagine 46 and aspartate 52 to the catalytic mechanism of chicken egg white lysozyme. *Biochemistry* 35, 1890-1896.

Matsuura K, Ishikura M, Nakayama T. (1993). Ecological studies on reovirus pollution of rivers in Toyoma Prefecture. II. Molecular epidemiological study of reoviruses isolated from river water. *Microbiol Immunol* 37, 305-310.

McCrae MA. (1981). Terminal structure of reovirus RNAs. *J Gen Virol* 55, 393-403.

McDermott KM, Crocker PR, Harris A, Burdick MD, Hinoda Y, Hayashi T, Imai K, Hollingsworth MA. (2001). Overexpression of MUC1 reconfigures the binding properties of tumor cells. *Int J Cancer* 94, 783-791.

Miller JE, Samuel CE. (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.

Mochizuki M, Tamazumi T, Kawanishi A. (1992). Serotype 2 reoviruses from the feces of cats with and without diarrhea. *J Vet Med Sci* 54, 963-968.

Morecki R, Glaser JH, Johnson AB, Kress Y. (1984). Detection of reovirus type 3 in the porta hepatis of an infant with extrahepatic biliary atresia: ultrastructural and immunocytochemical study. *Hepatology* 4, 1137-1142.

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

Muscillo M, Carducci A, Larosa G. (1997). Adriatic seawater by cell culture, polymerase chain reaction and polyacrylamide gel electrophoresis. *Water Res* 31, 1980-1984.

Nason EL, Wetzel JD, Mukherjee SK, Barton ES, Prasad BV, Dermody TS. (2001). A monoclonal antibody specific for reovirus outer-capsid protein sigma3 inhibits sigma1-mediated hemagglutination by steric hindrance. *J Virol* 75, 6625-6634.

Nibert ML, Fields BN. (1992). A carboxy-terminal fragment of protein mu 1/mu 1C is present in infectious subvirion particles of mammalian reoviruses and is proposed to have a role in penetration. *J Virol* 66, 6408-6418.

Nibert ML, Leslie SA. (2001). Reoviruses and Their Replication. *Fundamental Virology Fourth Edition*, 793-842.

Nibert ML, Odegard AL, Agosto MA, Chandran K, Schiff LA. (2005). Putative autocleavage of reovirus *mu1* protein in concert with outer-capsid disassembly and activation for membrane permeabilization. *J Mol Biol* 345, 461-474.

Nibert ML, Schiff LA, Fields BN. (1991). Mammalian reoviruses contain a myristoylated structural protein. *J Virol* 65, 1960-1967.

Noble S, Nibert ML. (1997). Characterization of an ATPase activity in reovirus cores and its genetic association with core-shell protein λ 1. *J Virol* 71, 2182-2191.

Nonoyama M, Millward S, Graham AF. (1974). Control of transcription of the reovirus genome. *Nucleic Acids Res* 1, 373-385.

Norman KL, Coffey MC, Hirasawa K, Demetrick DJ, Nishikawa SG, DiFrancesco LM, Strong JE, Lee PW. (2002). Reovirus oncolysis of human breast cancer. *Hum Gene Ther* 13, 641-652.

Norman KL, Hirasawa K, Yang AD, Shields MA, Lee PW. (2004). Reovirus oncolysis: the Ras/RalGEF/p38 pathway dictates host cell permissiveness to reovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11099-11104.

Odegard AL, Chandran K, Zhang X, Parker JS, Baker TS, Nibert ML. (2004). Putative autocleavage of outer capsid protein *micro1*, allowing release of myristoylated peptide *micro1N* during particle uncoating, is critical for cell entry by reovirus. *J Virol* 78, 8732-8745.

Organ EL, Rubin DH. (1998). Pathogenesis of reovirus gastrointestinal and hepatobiliary disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 233, 67-83.

Ostermann G, Weber KS, Zerneck A, Schroder A, Weber C. (2002). JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nat Immunol* 3, 151-158.

Pacitti AF, Gentsch JR. (1987). Inhibition of reovirus type 3 binding to host cells by sialylated glycoproteins is mediated through the viral attachment protein. *J Virol* 61, 1407-1415.

Paul RW, Lee PW. (1987). Glycophorin is the reovirus receptor on human erythrocytes. *Virology* 159, 94-101.

Poggioli GJ, Keefer C, Connolly JL, Dermody TS, Tyler KL. (2000). Reovirus-induced G(2)/M cell cycle arrest requires signals and occurs in the absence of apoptosis. *J Virol* 74, 9562-9570.

Powell KF, Harvey JD, Bellamy AR. (1984). Reovirus RNA transcriptase: evidence for a conformational change during activation of the core particle. *Virology* 137, 1-8.

Prota AE, Campbell JA, Schelling P, Forrest JC, Watson MJ, Peters TR, Aurrand-Lions M, Imhof BA, Dermody TS, Stehle T. (2003). Crystal structure of human junctional adhesion molecule 1: implications for reovirus binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5366-5371.

Proud CG. (1995). PKR: a new name and new roles. *Trends Biochem Sci* 20, 241-246.

Reed LJ and Muench H. (1932). A simple method for estimating 50% endpoints. *Am J Hyg* 27, 493-497.

Reinisch KM, Nibert ML, Harrison SC. (2000). Structure of the reovirus core at 3.6 Å resolution. *Nature* 404, 960-967.

- Richardson SC, Bishop RF, Smith AL.** (1994). Reovirus serotype 3 infection in infants with extrahepatic biliary atresia or neonatal hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* *9*, 264-268.
- Roner MR, Bassett K, Roehr J.** (2004). Identification of the 5' sequences required for incorporation of an engineered ssRNA into the Reovirus genome. *Virology* *329*, 348-360.
- Roner MR, Joklik WK.** (2001). Reovirus reverse genetics: Incorporation of the CAT gene into the reovirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* *98*, 8036-8041.
- Rosen L.** (1962). Reoviruses in animals other than man. *Ann N Y Acad Sci* *101*, 461-465.
- Rosen L, Hovis JF, Mastrota FM.** (1960). Observations on a newly recognized virus (Abney) of the reovirus family. *Am J Hyg* *71*, 258-265.
- Rubin DH, Weiner DB, Dworkin C, Greene MI, Maul GG, Williams WV.** (1992). Receptor utilization by reovirus type 3: distinct binding sites on thymoma and fibroblast cell lines result in differential compartmentalization of virions. *Microb Pathog* *12*, 351-365.
- Sabin AB.** (1959). Reoviruses. *Science* *130*, 1387-1389.
- Samuel CE.** (2001). Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* *14*, 778-809.
- Sharpe AH, Fields BN.** (1985). Pathogenesis of viral infections. Basic concepts derived from the reovirus model. *N. Eng. J. Med.* *312*, 486-497.
- Shatkin AJ, LaFiandra AJ.** (1972). Transcription by infectious subviral particles of reovirus. *J Virol* *10*, 698-706.

Shatkin AJ, Sipe JD. (1968). RNA polymerase activity in purified reoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* *61*, 1462-1469.

Shatkin AJ, Sipe JD, Loh P. (1968). Separation of ten reovirus genome segments by polyacrylamide gel electrophoresis. *J Virol* *2*, 986-991.

Shing M, Coombs KM. (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.

Silverstein SC, Astell C, Levin DH, Schonberg M, Acs G. (1972). The mechanisms of reovirus uncoating and gene activation in vivo. *Virology* *47*, 797-806.

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

Smith RE, Zweerink HJ, Joklik WK. (1969). Polypeptide components of virions, top component and cores of reovirus type 3. *Virology* *39*, 791-810.

Sokol RJ, Mack C. (2001). Etiopathogenesis of biliary atresia. *Semin Liver Dis* *21*, 517-524.

Spandidos DA, Krystal G, Graham AF. (1976). Regulated transcription of the genomes of defective virions and temperature-sensitive mutants of reovirus. *J Virol* *18*, 7-19.

Spriggs DR, Bronson RT, Fields BN. (1983). Hemagglutinin variants of reovirus type 3 have altered central nervous system tropism. *Science* *220*, 505-507.

Spriggs DR, Fields BN. (1982). Attenuated reovirus type 3 strains generated by selection of haemagglutinin antigenic variants. *Nature* *297*, 68-70.

Starnes MC, Joklik WK. (1993). Reovirus protein lambda 3 is a poly(C)-dependent poly(G) polymerase. *Virology* 193, 356-366.

Strong JE, Leone G, Duncan R, Sharma RK, Lee PW. (1991). Biochemical and biophysical characterization of the reovirus cell attachment protein sigma 1: evidence that it is a homotrimer. *Virology* 184, 23-32.

Strong JE, Coffey MC, Tang D, Sabinin P, Lee PW. (1998). The molecular basis of viral oncolysis: usurpation of the Ras signaling pathway by reovirus. *EMBO J* 17, 3351-3362.

Strong JE, Lee PW. (1996). The v-erbB oncogene confers enhanced cellular susceptibility to reovirus infection. *J Virol* 70, 612-616.

Strong JE, Tang D, Lee PW. (1993). Evidence that the epidermal growth factor receptor on host cells confers reovirus infection efficiency. *Virology* 197, 405-411.

Sturzenbecker LJ, Nibert M, Furlong D, Fields BN. (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.

Tang D, Strong JE, Lee PW. (1993). Recognition of the epidermal growth factor receptor by reovirus. *Virology* 197, 412-414.

Thirukkumaran CM, Luider JM, Stewart DA, Cheng T, Lupichuk SM, Nodwell MJ, Russell JA, Auer IA, Morris DG. (2003). Reovirus oncolysis as a novel purging strategy for autologous stem cell transplantation. *Blood* 102, 377-387.

Tosteson MT, Nibert ML, Fields BN. (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.

Tyler KL, Barton ES, Ibach ML, Robinson C, Campbell JA, O'Donnell SM, Valyi-Nagy T, Clarke P, Wetzel JD, Dermody TS. (2004). Isolation and molecular characterization of a novel type 3 reovirus from a child with meningitis. *J Infect Dis* 189.

Tyler KL, McPhee DA, Fields BN. (1986). Distinct pathways of viral spread in the host determined by reovirus S1 gene segment. *Science* 233, 770-774.

Tyler KL, Sokol RJ, Oberhaus SM, Le M, Karrer FM, Narkewicz MR, Tyson RW, Murphy JR, Low R, Brown WR. (1998). Detection of reovirus RNA in hepatobiliary tissues from patients with extrahepatic biliary atresia and choledochal cysts. *Hepatology* 27, 1475-1482.

Tyler KL, Squier MK, Rodgers SE, Schneider BE, Oberhaus SM, Grdina TA, Cohen JJ, Dermody TS. (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.

van Klinken BJ, Oussoren E, Weenink JJ, Strous GJ, Buller HA, Dekker J, Einerhand AW. (1996). The human intestinal cell lines Caco-2 and LS174T as models to study cell-type specific mucin expression. *Glycoconj J* 13, 757-768.

van Raaij MJ, Mitraki A, Lavigne G, Cusack S. (1999). A triple beta-spiral in the adenovirus fibre shaft reveals a new structural motif for a fibrous protein. *Nature* 401, 935-938.

Ward RL, Shatkin AJ. (1972). Association of reovirus mRNA with viral proteins: a possible mechanism for linking the genome segments. *Arch Biochem Biophys* 152, 378-384.

- Watanabe Y, Millward S, Graham AF.** (1968). Regulation of transcription of the Reovirus genome. *J Mol Biol* 36, 107-123.
- Weiner HL, Fields BN.** (1977). Neutralization of reovirus: the gene responsible for the neutralization antigen. *J Exp Med* 146, 1305-1310.
- Weiner HL, Greene MI, Fields BN.** (1980). Delayed hypersensitivity in mice infected with reovirus. I. Identification of host and viral gene products responsible for the immune response. *J Immunol* 125, 278-282.
- Weiner HL, Raming RF, Mustoe TA, Fields BN.** (1978). Identification of the gene coding for the hemagglutinin of reovirus. *Virology* 86, 581-584.
- Weiner JR, Bartlett JA, Joklik WK.** (1989). The sequences of reovirus serotype 3 genome segments M1 and M3 encoding the minor protein $\mu 2$ and the major non-structural protein μNS , respectively. *Virology* 169, 293-304.
- Wenske EA, Chanock SJ, Krata L, Fields BN.** (1985). Genetic reassortment of mammalian reoviruses in mice. *J Virol* 56, 613-616.
- Williams LA, Martin-Padura I, Dejana E, Hogg N, Simmons DL.** (1999). Identification and characterisation of human Junctional Adhesion Molecule (JAM). *Mol Immunol* 36, 1175-1188.
- Wilson GA, Morrison LA, Fields BN.** (1994). Association of the reovirus S1 gene with serotype 3-induced biliary atresia in mice. *J Virol* 68, 6458-6465.
- Xu P, Miller SE, Joklik WK.** (1993). Generation of reovirus core-like particles in cells infected with hybrid vaccinia viruses that express genome segments L1, L2, L3, and S2. *Virology* 197, 726-731.

Yang WQ, Senger DL, Lun XQ, Muzik H, Shi ZQ, Dyck RH, Norman K, Brasher PM, Rewcastle NB, George D, Stewart D, Lee PW, Forsyth PA. (2004). Reovirus as an experimental therapeutic for brain and leptomeningeal metastases from breast cancer. *Gene Ther* 11, 1579-1589.

Yeung MC, Gill MJ, Suleiman SS, Shahrabadi MS, Lee PW. (1987). Purification and characterization of the reovirus cell attachment protein $\sigma 1$. *Virology* 156, 377-385.

Yin P, Cheang M, Coombs KM. (1996). The M1 gene is associated with differences in the temperature optimum of the transcriptase activity in reovirus core particles. *J Virol* 70, 1223-1227.

Yue Z, Shatkin AJ. (1997). Double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) is regulated by reovirus structural proteins. *Virology* 234, 364-371.

Zweerink HJ. (1974). Multiple forms of SS leads to DS RNA polymerase activity in reovirus-infected cells. *Nature* 247, 313-315.

Zweerink HJ, Ito Y, Matsuhisa T. (1972). Synthesis of reovirus double-stranded RNA within virionlike particles. *Virology* 50, 349-358.

Zweerink HJ, Joklik WK. (1970). Studies on the intracellular synthesis of reovirus-specified proteins. *Virology* 41, 501-518.