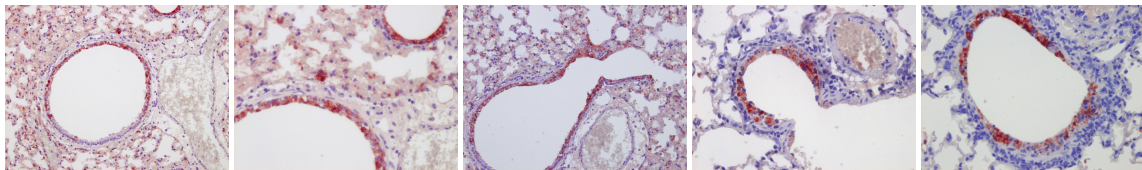


Contribution à l'étude de l'activité antivirale et du mécanisme moléculaire de la MX1 bovine



Etienne BAISE

Thèse présentée en vue de l'obtention du titre de Docteur en Sciences
Année académique 2008-2009

Τὰ πάντα ῥεῖ καὶ οὐδὲν μένει.

Héraclite d'Ephèse (VI^e siècle avant J.-C.)

Remerciements

Satisfaire à l'exercice délicat que constitue l'écriture de remerciements, n'est pas loin de figurer parmi les tâches les plus redoutables d'une thèse. Non qu'exprimer sa gratitude envers ceux qui, de quelque façon que ce fût, vous ont apporté leur soutien, se dresse comme un obstacle psychologiquement difficile à franchir ; non que la crainte d'oublier une personne importante inhibe l'auteur (quoique ?) A vrai dire, le choix de la formule - qui se doit d'être percutante mais calibrée - la quête de ce subtil dosage entre une certaine solennité naturellement requise par les circonstances et un humour qu'autorise les amitiés bien établies, la recherche d'un style que l'on voudrait léger voire aérien, se révèlent les redoutables castrateurs de l'inspiration d'un récipiendaire, guetté par l'épuisement de ce long cheminement, de ses errements et...de l'âge avançant. Après ce préambule, indispensable avertissement, je voudrais encore, avant de coucher sur le papier, cet « acte authentique » de remerciements sincères et émus, avouer que ma tentation fut grande d'insérer ici une série, courte il est vrai, de « non merci » mais comme indiqué, elle fut...

L'honneur m'est donné de remercier en tout premier lieu le professeur Freddy Coignoul qui a accueilli avec enthousiasme et intérêt, les recherches en biologie cellulaire et moléculaire menées, loin des préoccupations premières qui sont les siennes, au sein de son service de pathologie. Dans cet intérêt évident pour des disciplines venues d'ailleurs, je suis convaincu que nous devons y voir l'ouverture d'esprit absente trop souvent du sein des équipes de recherche, fussent-elles des plus performantes, mais indispensable si l'objectif est de se donner la chance de réaliser les avancées les plus significatives qui, comme chacun le sait, sont tapies dans les zones obscures, bordant les frontières entre les différents champs de connaissance. Par ailleurs, l'élégance naturelle de son discours souvent teinté d'un humour subtil, restera comme un modèle, une Joconde de l'art oratoire dont les copies même maladroitement, conservent une certaine « gueule »...

Sur le professeur Daniel Desmecht, repose la responsabilité entière de cette thèse. Il m'a, en effet, donné l'opportunité d'entreprendre cette aventure à travers une série d'initiatives. D'abord, il a créé *ab ovo* le laboratoire qui en a été le berceau. Ensuite, auteur du projet « MX », il a, sans relâche, assuré le développement de son équipe et élargi, avec succès, l'horizon de ses recherches. En quelques années, tant sur le plan de l'équipement que sur celui du personnel, le professeur Daniel Desmecht est parvenu à constituer un environnement scientifique de qualité. Aujourd'hui, les publications issues de ses travaux témoignent de l'ampleur de l'activité déployée. Sa ténacité et sa passion servies par ses vastes connaissances et son esprit visionnaire, il les a mises au service de la recherche et de nombreux chercheurs lesquels, j'en suis convaincu, sont conscients de leur heureuse fortune. Merci pour la confiance qu'il m'a accordée ; merci d'avoir été le promoteur efficace et enthousiaste dont j'avais besoin.

Dès le début de l'odyssée « BoMX », j'ai eu la chance d'avoir à mes côtés un jeune technicien adroit, passionné, curieux et doté d'un esprit scientifique rigoureux. Plus encore que ses qualités professionnelles remarquables, c'est l'aspect humain qu'il a toujours privilégié dans ses relations tant au sein du laboratoire que dans le domaine privé que je garde en souvenir de cette période formidable. Monsieur Gregory Pire – Greg pour les nombreux intimes – fait partie de ces quelques rares personnes qui parviennent à marier une grande indépendance d'esprit et une sociabilité hors du commun. Aujourd'hui, il exerce ses talents au sein d'une grande société pharmaceutique, loin de nos modestes installations de recherche. Cependant, dans cet environnement que j'imagine standardisé et « standardisant », je suis certain qu'il a su garder ce caractère atypique qui lui vaut certainement la reconnaissance de ses collaborateurs... Pour toutes ces heures passées au service de cette thèse et d'autres travaux connexes, je veux t'exprimer ici, Greg, ma plus grande reconnaissance...

Autre personnage atypique s'il en est, membre de la première escouade, du trio initial, cette « dream team » dont la première mission fut d'étudier le marché... de la pipette automatique, indispensable outil en biologie moléculaire et cellulaire mais absente

de l'infrastructure de base, Monsieur Joël Gérardin a participé avec délectation et abnégation à ce saut dans le vide que représentait son engagement dans cette aventure. Après avoir pris une part active et efficace à la constitution d'un laboratoire initial, il a, pendant plusieurs années, étudié le gène *bomx1*, son promoteur et son polymorphisme chez différentes races, tout en élargissant son horizon aux espèces voisines de *Bos taurus*. C'est avec émotion que je me souviens de nos longues discussions techniques ou carrément savantes, qui, le soir ou à la nuit tombée, occupaient nos bureaux, baignés par les parfums enivrants de la nécropsie... Merci à toi, Jojo, pour ces années de partage de connaissances scientifiques et autres.

D'abord intéressé par la recherche en aquaculture, Michael Leroy a rejoint l'équipe nouvellement constituée dans le cadre d'un doctorat. Chercheur infatigable, il s'est consacré pleinement à la poursuite de ses objectifs, participant activement au développement de notre petite équipe. Plus encore, il a apporté une importante contribution à l'implémentation de nouvelles techniques au sein du laboratoire, techniques largement utilisées par les autres équipes du groupe. Ce fut pour moi un plaisir d'aborder la cytométrie en flux en sa compagnie et plus encore de partager plusieurs années durant, un même bureau. Curieux, ses nombreuses questions ont souvent alimenté une réflexion qui a permis au binôme, j'ai la prétention de le penser, de progresser. L'évocation du temps de notre collaboration efficace reste et restera pour moi, Mike, un excellent souvenir sur les plans professionnels et humains.

Le laboratoire était encore bien jeune lorsque je découvris une nouvelle recrue qui s'intéressait à nos travaux. Après avoir réussi, étape obligée, l'épreuve du FRIA, Mélanie Palm, Mel plus simplement, s'attela, avec un succès évident, à l'étude de la MX porcine. Ce fut un plaisir de travailler avec elle et de partager les doutes, les hypothèses et les confirmations qui émaillent inévitablement ce type de recherche. De plus, la touche féminine et germanique qu'elle distilla, n'est pas étrangère à la bonne humeur qui prévalait parmi nous.

Le microcosme MX inspira encore une autre chercheuse que j'avais déjà eu le plaisir, *in tempore non suspecto*, de rencontrer car elle s'intéressait à des bactéries appartenant à un genre qui m'était cher, le genre *Helicobacter*... Prenant le taureau par les cornes si j'ose dire, Anne Thomas décrivit notamment la structure génomique du gène Mx porcin et contribua ainsi à la réputation du laboratoire dans ce domaine, nous apportant par la même occasion une série d'informations précieuses pour lesquelles je la remercie.

Il y a quelques années déjà, alors qu'il présentait l'épreuve finale du graduat en biotechnologie, j'avais eu l'honneur de faire partie du jury de Thomas Fett, aussi connu chez nous sous l'amical pseudonyme de « Kascap le mauve »... Malgré cette expérience qui aurait pu ou dû le traumatiser, il est venu accomplir le « TFE » qui sanctionna son diplôme d'ingénieur au sein de notre équipe MX. Se rendant de plus en plus indispensable, il devint incontournable et nombreux sont ceux qui lui sont redevables d'avoir bouclé articles et thèses. Thomas, sache ici que j'ai vraiment apprécié ta collaboration, ton dévouement ; je te souhaite beaucoup de succès dans tes propres recherches et, de façon plus générale, un très bel avenir.

Personnage professionnellement discret et efficace, diva au « bench » mais aussi diva tout court (l'avez-vous déjà entendue chanter, le soir, impromptue au banquet d'une noce ou attendue sur scène par une foule conquise ?), Aurore, pardon Madame Aurore Broers, a apporté sérénité et sécurité, des valeurs essentielles, pour le chercheur souvent traversé par le doute expérimental (ai-je bien ajouté le produit x au milieu y dans les puits de la rangée z, il y a trois jours ???), doute qui, contrairement, à son *alter ego* scientifique, n'est que ruine de la connaissance. Merci Aurore pour cette rigueur, cette fiabilité et merci pour les illuminations de ta voix, les jours de détente.

Parmi les derniers arrivés, figure Mutien-Marie Garigliany dont une de mes dernières expériences (ou « manip ») a bénéficié de l'aide efficace et pour laquelle je le remercie. D'autre part, et sans dévoiler des secrets stratégiques, je n'ignore pas que « Mutien » a mené à bien des protocoles originaux dont les résultats assoiront certainement la renommée du laboratoire dans le domaine de la réponse innée.

Dans la vie d'un chercheur, l'importance de la qualité relationnelle entre les différentes équipes est primordiale et les rivalités internes à proscrire ; seuls, une saine émulation et un enthousiasme partagé, se concrétisant par une mise en commun des connaissances sont sources de progrès scientifiques et...humains. Dois-je le dire, la règle était d'application pendant toutes ces années au sein du service de pathologie et elle n'a souffert que de très rares exceptions. Au quotidien, j'ai eu le plaisir de partager les problèmes et les réussites de chercheurs engagés sur des thèmes parfois assez éloignés des nôtres. Au rang de ceux-ci figurent François Cornet, l'homme des « aptamères » et de bien d'autres choses...dont le bricolage de haut vol ! Nos interactions sur le plan « technico-scientifique » furent toujours plaisantes et intéressantes, le questionnement de François étant toujours pertinent et « challengeant »! Et puis, il y avait l'humour, la bonne humeur, le « pittoresque » du personnage, des atouts au sein d'un groupe ! J'ai écrit pittoresque ? Alors, c'est ici qu'il me faut citer la plus bruyante d'entre toutes les icônes du service, du département, de la Faculté ... celle qui exerce ses talents sur un monde où paradoxalement règne un silence de mort, je veux bien entendu parler de Madame Dominique Cassart, alias « Mamy ». Avant de la connaître, je me demandais comment il était possible d'être passionné par l'autopsie et ses odeurs, l'histopathologie et ses descriptions alambiquées. Nos longues discussions n'ont certes pas fait de moi un spécialiste en ces disciplines mais elles m'ont fait prendre conscience de leur intérêt. De nos confrontations, j'ai retenu l'indispensable complémentarité des approches morphologiques et moléculaires dans le domaine de la recherche médicale. Grâce à son enthousiasme pour l'étude des équidés et de leurs pathologies, j'ai eu le plaisir de suivre et même la chance de participer à l'aventure passionnante de la « myopathie atypique »...Enfin et surtout, la personnalité de Dominique constitue une forme de richesse particulière qui rayonne sur l'atmosphère d'un laboratoire, un cadeau que j'ai pu apprécier tout au long de ces années. Parallèlement, j'ai eu la chance d'interagir avec Pedro Faisca, vétérinaire portugais qui avait, fort opportunément, choisi de faire ses études de troisième cycle à Liège (ce choix a-t-il été influencé par des éléments « footballistiques » ?). Infection de souris, culture de virus et titration virale, suivi des paramètres respiratoires, examen post-mortem des tissus pulmonaires... toutes ces techniques ont été prétexte à de nombreuses confrontations

constructives, débats contradictoires et réflexions. Ce fut pour moi une approche expérimentale des plus enrichissantes de la physiopathologie...Au-delà de ses qualités professionnelles, « oune mec » comme Pedro ne peut attirer que la sympathie tant sa gentillesse et son inclination naturelle à porter de l'attention aux autres sont omniprésentes. Merci à toi, Pedro, pour cette façon d'être et pour ta disponibilité. Juste à côté de la Lusitanie, la quête doctorale avait placé le Đại Việt en la personne de Dao et ce couple a très bien fonctionné ! Au cours des mois et des années qui défilèrent « à la vitesse d'un cheval au galop », j'ai pu apprécier l'avancement des travaux de Dao mais j'ai aussi découvert un peu de son pays, de sa vision du monde et...à l'instar d'autres membres du service, j'ai outrageusement profité des spécialités culinaires vietnamiennes (qui a oublié ce somptueux repas qu'il avait préparé, en compagnie de sa femme, à l'intention des membres de notre service ?). Une expérience humaine dans un environnement inattendu et pour laquelle, Dao, je me fais une joie de te remercier ! J'ai également eu la chance de compter parmi les collaborateurs de ce service, un certain Laurent Zecchinon. Ses recherches avaient alors pour objectif de découvrir les mécanismes moléculaires d'une toxine particulière et ce fut bien entendu un sujet passionnant qui nous a permis de procéder à de nombreux échanges qui ont élargi mon champ de connaissances. Mais Laurent est un personnage dont les qualités extra-académiques ne se limitent pas à son statut d' « aikidoka », et englobent celles d'organisateur d'éléments festifs (jeux et paris divers prétextes à quelques drinks mémorables, BBQ...), sans oublier l'animation régulière des boîtes e-mail (la blague du lundi matin, la gore de la semaine, la minute philosophique...) et autres fantaisies qui distillent la bonne humeur indispensable à la pratique d'une recherche saine par un esprit sain. Pour cette dualité entre le sérieux professionnel et le divertissement en offrande indispensable à tous, sois assuré, Laurent, de ma reconnaissance.

Quelqu'un a écrit : « Une thèse est une aventure trop souvent égoïste dont l'action se situe au milieu de compagnons de fortune » (ou d'infortune ?). Le rôle primordial de ceux-ci, confusément ressenti, ne se révèle vraiment que lorsque les chemins se séparent. Ce ne sont pas des remerciements que j'adresserai à Sandra, Carine, Stéphanie, Philippe,

Adélite, Cédric, Annabelle, Anne, Vanessa, Amélie, Nicolas, Thierry, Hussein,...préférant cultiver le souvenir de tous ces moments essentiels, insaisissables et incomparables, gravés au sein de ma mémoire par autant de touches colorées, tableau impressionniste d'une tranche de vie inoubliable.

Autrefois, la recherche scientifique menée au sein des Universités en général, de notre *Alma mater* en particulier, se caractérisait par une liberté quasi totale d'action ! Aujourd'hui, un cadre administratif – sans doute nécessaire mais devenu peut-être excessif – s'est imposé. Toujours est-il que dans ce contexte, le développement d'une activité d'une certaine tenue ne peut se faire qu'à la condition *sine qua non* de travailler avec un secrétariat constitué de personnes qualifiées et motivées... ce qui était certainement le cas ! C'est donc avec joie que je saisis l'opportunité qui m'est donnée ici de remercier Lucie et Sandy, pour leur dévouement jamais démenti et leur accueil toujours charmant, symbolisés par la porte bloquée en position ouverte de leur bureau. Autre fonction essentielle est celle maîtrisée avec brio et enthousiasme par Carine, que j'ai souvent (trop peut-être ?) sollicitée pour « une petite commande! », ou tout autre demande réclamant son expertise comptable. Pour l'efficacité et la gentillesse avec laquelle tu as, sans exception, traité les divers dossiers et demandes, je suis à coup sûr, Carine, débiteur d'une reconnaissance dont je ne pourrai sans doute jamais m'acquitter. Il me faut encore préciser qu'il m'a été particulièrement agréable de constater que le sérieux des tâches administratives et financières accomplies par le secrétariat, n'a jamais empêché l'humour de conserver la place qu'il mérite... !

Au-delà du champ d'étude de cette thèse, travailler dans un service qui s'occupe d'autopsies m'a offert la possibilité de « toucher du doigt », un nombre non négligeable de pathologies, celles dont on entend parler au quotidien mais dont la matérialité vous échappe jusqu'à ce qu'un prosecteur vous laisse pénétrer dans son antre et, grâce à sa maîtrise technique, vous fasse apparaître, sous leurs meilleurs jours, sarcomes, infarctissements, ou encore ces trop fameux entrappements du petit intestin sur le ligament gastro-splénique. Longtemps, je me souviendrai de cette salle gérée par l'homme aux couteaux virevoltants, remplie le matin de cadavres dépecés et si propre le soir qu'on

aurait pu y manger sans crainte ...Merci Michel pour m'avoir, à travers ton travail, permis de découvrir une réalité dont je n'avais reçu qu'un aperçu très théorique et merci aussi pour cette joie que tu ne cesses de distiller au sein du service, plus particulièrement à l'heure du déjeuner. Souvent, l'observation macroscopique se doit d'être affinée par l'examen microscopique et c'est là qu'interviennent les mains expertes de Michaël Sarlet. Meticuleux et efficace – j'ai eu l'opportunité de le vérifier en travaillant avec lui à la modification de quelques protocoles – il reste ouvert à de nouvelles techniques et c'est toujours avec plaisir que j'ai pu interagir avec lui. Pour cette convivialité professionnelle, je le remercie très vivement. Mais je ne serais pas complet si je ne précisais que Michaël est un homme qu'on apprécie aussi pour ses qualités humaines et sa capacité à partager des éléments substantiels ou plus anodins de la vie.

Avant de rejoindre le département de morphologie et de pathologie, j'avais déjà passé un nombre certain d'années au sein du service de biochimie de la Faculté des Sciences. Le plus souvent, mais pas exclusivement, les divers projets qui m'ont employé, présentaient une finalité pratique pour ne pas dire commerciale. Appliqués ou pas, ils m'ont permis de progresser et je saisis ici la chance qui m'est offerte de remercier Monsieur le Professeur Charles Gerday, pour la confiance qu'il m'a accordée tout au long de ces années. Il va sans dire que je garde de cette période un excellent souvenir. Merci donc « Chef », pour tout ce que vous m'avez apporté et m'apportez encore à l'heure du café... Bien entendu, je m'en voudrais de ne pas associer à cette reconnaissance tous ceux et celles, étudiants, assistants et techniciens que j'ai eu la chance de rencontrer dans votre service. En particulier, je citerai Madame Nicole Otthiers et Monsieur René Marchand avec lesquels la collaboration a toujours été des plus enrichissantes. Et comment ne pas mettre ici en lumière le soutien indéfectible de celui que les hasards de la vie active ont voulu que nous nous rencontrions à de multiples reprises, Jean Marie François, aujourd'hui à nouveau mon collègue ?

Après avoir demandé pardon à tous ceux que j'ai oublié de nommer, je ne saurais clore ces remerciements sans élargir le champ, sortir du cadre académique et me tourner un instant dérisoire, en comparaison de la prépondérance de leur rôle, vers ceux qui ont

été ou sont toujours présents tant au cours de périodes dominées par le doute ou la tristesse que lors d'épisodes remplis de joie et d'enthousiasme. A toi, d'abord, Dominique, « ma sœur », avec qui j'ai partagé tant de ces moments qui sont l'histoire de nos destinées respectives, je veux témoigner publiquement de mon attachement. A ce lien si indéfinissable qui nous unit et qui intrigue parfois nos proches, il m'est comme une évidence de lui accorder la place primordiale qui lui revient. Ensuite, je voudrais associer à ces remerciements ceux que je considère aujourd'hui comme faisant partie d'une grande famille dont les liens se sont forgés dans le creuset de nos jeunesses contrariées ou insouciantes, mais constamment alimenté en solidarité et en amitié. A ceux et celles que je fréquente encore régulièrement aujourd'hui comme à ceux et celles que je sais toujours prêts à partager quelques moments privilégiés, je voudrais éviter de leur adresser quelque banalité de circonstances...mais comment ne pas écrire simplement « merci » pour ne pas trahir davantage cette émotion qui, en cet instant précis, m'envahit ? Philippe, Patrick et Patrick, Guy, Marc, Michèle et Michèle, Anne, Georges, Christian, Jacques, Jean Marc,...vous citer tous ou non ne changera rien : vous habitez pour toujours au panthéon de mon cœur.

Ils ont d'abord peuplé mes rêves d'enfant. Ambassadeurs nés, ils m'ont ensuite introduits auprès de personnes remarquables avec lesquelles j'ai partagé une passion commune, parcouru un bout de chemin, vécu des événements fantastiques ou émouvants ; la destinée en a éloigné certaines, temporairement ou définitivement ; avec d'autres, j'ai noué des liens très forts, des amitiés irrévocables. Aujourd'hui, ils ont largement mérité d'être mis à l'honneur ; je les remercie de jouer à nouveau leur rôle d'intermédiaire, et de me permettre d'évoquer ici, par leur truchement, l'importance affective des relations issues de leur fréquentation assidue. Merci donc à Dolly, Okla, Mystère, Loustic, Moka, Fury, Windgirl, Volcan, Kiroko...et tous ceux de leur espèce que j'ai eu le plaisir de côtoyer. Merci aussi aux membres du Royal Cercle Equestre l'Eperon pour leur accueil.

Enfin, je terminerai en évoquant un personnage qui symbolise le renouveau à travers des valeurs de fraternité, d'égalité et d'unité. Transcendant, pour quelques heures, l'homme qui Le célèbre, Il l'élève, par l'effacement des traces d'un individualisme

méprisable, au rang de la divinité. C'est un peu de ce Gille authentique que je voudrais offrir à mes amis de la Principauté.

Les coupes histochimiques qui apparaissent sur la page de couverture ont été gracieusement fournies par Mutien-Marie Garigliany.

Le taureau qui y figure a été reproduit avec l'aimable autorisation de son auteur, Frederic Usclat, artiste peintre.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AEC	3-amino-9-éthylcarbazole
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNv	ARN viral (génomique)
ARNc	ARN complémentaire
ATP	Adénosine triphosphate
ATCC	<i>American type culture collection</i>
BoMX1	Protéine MX1 de <i>bos taurus</i>
BoPI-3	Parainfluenza de type 3 bovin
BoRSV	Virus respiratoire syncytial bovin
BSA	Sérumalbumine bovine
CDS	<i>Coding sequence</i> ou « séquence codante »
CF	Cytométrie en flux
CMV	Cytomégalovirus
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
dsARN	ARN bicaténaire
EIF2 α	Facteur 2 eucaryote d'initiation de la traduction
FCS	Serum fœtal de veau
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSC	Forward scatter
GAP	GTPase activator proteins
GDP	Guanosine diphosphate
GTPase	Guanosine triphosphatase
huMXA	Protéine MX A de <i>Homo sapiens</i>
HRP	Horseradish peroxydase
huRSV	Virus respiratoire syncytial humain
IF	Immunofluorescence
IFN	Interféron
IFNAR	Récepteur des interférons
I κ B	Facteur inhibiteur du facteur de transcription nucléaire κ B

IKK	Complexe IκB kinase
IL	Interleukine
ISG20	Interferon-stimulated gene product of 20 kDa
ISGF3	Facteur de stimulation de gènes sous contrôle d'IFN de type I
IRF	Interferon regulation factor
ISRE	Interferon sensitive responsive element
JNK	c-Jun N-terminal kinase
kDA	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK p38	Mitogen-activated protein kinase p38
MDBK	Madin Darby <i>bovine kidney</i>
MOI	Multiplicity of infection
MoMX1	Protéine MX1 de souris (<i>Mus musculus</i>)
MTS	[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphonyl)-2H]-tetrazolium
MTT	Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium
MyD-88	Facteur de différenciation myéloïde 88
NF-κB	Facteur nucléaire κB
NK	Natural killer
NLS	<i>Nuclear localisation signal</i>
OAS	2',5'-oligoadénylate synthétase
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate buffer system
PE	Phycoérythrine
PFU	Plaque forming unit
pi	Post infection
PKR	Protéine kinase R (dépendante de l'ARN bicaténaire)
Poly I:C	Acide polyinosique-polycytidylique (ARN bicaténaire synthétique)
poMX1	Protéine MX1 de <i>Sus scrofa</i> (porcine)
PRD	Proline rich domain
P/v	Poids/volume
PVDF	Polyvinylidène difluoride
RIG	Retinoic inducible gene 1
RIP-1	Receptor interacting protein 1

RSV	Respiratory syncytial virus
SD	Déviation standard
SH2	Src homology region
STAT	Signal de transduction et activateur de la transcription
ssARN	<i>Single-stranded</i> ARN ou ARN monocaténaire
SSC	Side scatter
TBK-1	TANK binding kinase-1
TBS	Tampon tris salin ou <i>Tris buffer salt</i>
TBST	Tampon tris salin + tween20
TCID ₅₀	<i>Tissue culture infectious dose 50</i>

Summary

Type I interferons (IFNs α/β) induce the synthesis of many factors belonging to the innate immune system which is known to play an essential role as the first defence line against the viral infection. Among these contributors, the MX protein (a member of the large GTPase family) along with the double stranded (ds) RNA dependent protein kinase R (PKR) and the 2'5' oligoadenylate synthetase/Rnase L system, has been shown to be one of the most efficient among the murine and the human species. The bovine counterpart of the MX system was, at the beginning of this work, described at the sole gene level (the CDS sequence) but its functional capacity was still totally unexplored. Accordingly, our first aim was to assess the ability of the bovine GTPase we called boMX1 to inhibit viruses infecting cattle. A Vero cell line (V103) conditionally expressing the boMX1 was established. To proof the concept, we firstly tested the inhibition of a canonical virus on this field, the *vesicular stomatitis virus* (VSV) which was confirmed to be as sensitive to boMX1 as previously shown to MXA (*Homo sapiens*). In a second step, we focused our investigation on the activity of boMX1 against two *Paramyxoviridae* viruses, the boRSV and the boPI3, both of these being sensitive to IFNs as reported in the literature and furthermore confirmed by our previous *in vitro* experiments. Although boMX1 was expected to be the most important factor of the type I interferon resistance recorded against boPI3 and boRSV, our study has shown that the bovine protein was not able to block these viruses belonging to the *Respirovirus* genus. Conversely, the famous *Orthomyxoviridae* virus member, Influenza A was shown to be almost completely inhibited in cells expressing boMX1. The inhibitory potential of boMX1 was so strong it could only be measured upon the replacement of the low pathogenic H1N1 strain used in the first assays by the hypervirulent H7N7 one. In this case, the protection rate was as high as 10^8 . Typically, the value found for the human counterpart MXA is in the range of $10^3 - 10^4$ and according to our knowledge, none of the MX proteins investigated so far have never been shown to be so effective against Influenza A. In the wave of these results, the well-known avian H5N1 Influenza A

strain has been tested *in vitro* and *in vivo*. All the data reinforced the concept of a very high anti-Influenza A activity for BoMX1.

A such important antiviral effect appeared as an opportunity to initiate an experimental approach of the largely unknown underlying mechanism(s) of the MX antiviral activity. Our first objective was to identify the “*primum movens*” of the inhibition mechanism. Therefore, we followed the kinetic of the infection in V103 expressing or not the boMX1 during one single cycle. The evidence of an important activity of the bovine GTPase in the first hours post-infection led us to identify at the RNA level which replication step was the first to be blocked. Following the collected results, we adapted a primer extension method to quantify the genomic viral RNA (vRNA) early entry in the induced and non induced cell cultures. Finally, we tested a first interaction hypothesis between the boMX1 and a potential interacting protein sister.

*

*

*

LISTE DES ABREVIATIONS	13
SUMMARY	16
I. INTRODUCTION.....	21
GENERALITES.....	21
I.1.1. LA SUPERFAMILLE DES DYNAMINES.....	21
<i>Généralités</i>	<i>21</i>
<i>Structure</i>	<i>21</i>
<i>Classification des dynamines.....</i>	<i>28</i>
I.1.2. INTERFERONS ET ACTIVITE ANTIVIRALE	32
<i>Réponse innée et interférons.....</i>	<i>32</i>
I.1.3. LES INTERFERONS DE TYPE I α/β	34
<i>Organisation génomique et protéique</i>	<i>34</i>
<i>Région promotrice des interférons de type I α/β.....</i>	<i>35</i>
I.1.4. INFECTION VIRALE ET INDUCTION DES INTERFERONS DE TYPE I.....	36
<i>Voie classique.....</i>	<i>36</i>
<i>Voie "Toll-like".....</i>	<i>38</i>
I.1.5. LES PROTEINES CELLULAIRES DE LA RESISTANCE INNEE.....	43
<i>Effecteurs antiviraux cellulaires à mécanisme connu</i>	<i>43</i>
<i>Effecteurs antiviraux cellulaires à mécanisme inconnu</i>	<i>45</i>
I.2 LE SYSTEME MX.....	46
I.2.1. GENERALITES	46
<i>Aspects historiques</i>	<i>46</i>
<i>Régulation de l'expression de MX</i>	<i>46</i>
<i>Organisation du promoteur du gène Mx</i>	<i>47</i>
<i>Activation du promoteur du gène Mx</i>	<i>48</i>
<i>Cylocalisation des protéines MX.....</i>	<i>48</i>
<i>Structure des protéines MX</i>	<i>50</i>
<i>Activité GTPasique de MX</i>	<i>54</i>
I.2.2. FONCTIONS ANTIVIRALES	55
<i>Domaines concernés par l'activité antivirale</i>	<i>55</i>
<i>Mécanisme d'action des protéines MX</i>	<i>56</i>
I.3. LES PROTEINES MX BOVINES	65
I.3.1. GENERALITES	65
I.3.2. ORGANISATION DU GENE ET DU PROMOTEUR DE BOMX1.....	65
I.3.3. ANALYSE DE L'EXPRESSION	66
I.4. OBJECTIFS.....	68
II. MATERIEL ET METHODES	69
II.1. ASPECTS BIOLOGIQUES	69
II.1.1. CELLULES.....	69
II.1.2. VIRUS.....	69
II.2. ASPECTS METHODOLOGIQUES	70
II.2.1. Détermination du titre viral.....	70
II.2.2. Mesure de la cytotoxicité par la méthode MTS.....	70
II.2.3. Immunofluorescence	71
II.2.4. Cytométrie en flux.....	71
II.2.5. Immunomarquage des protéines sur membrane	72
II.2.6. Immunodétection.....	73
II.2.7. Vecteurs	74

II.2.8. Préparation du cDNA codant pour BoMX1	76
II.2.9. Contrôle de l'inhibition épigénétique.....	81
II.2.10. Northern Blotting.....	83
II.2.11. Analyse par extension d'amorces.....	85
II.1.12. qRT-PCR.....	87
III. RÉSULTATS	89
III.1. EXPRESSION CONDITIONNELLE STABLE DE BOMX1 EN CELLULES VERO.....	89
III.1.1. CLONAGE DU CDNA DE BoMX1.....	89
III.1.2. SEQUENCE DU CDNA BoMX1	90
III.1.3. CONSTRUCTION DU PCDNA4-BoMX1	90
III.1.4. EXPRESSION TRANSITOIRE DE BOMX1 EN CELLULES VERO	93
III.1.5. ETABLISSEMENT D'UNE LIGNEE TRANSGENIQUE VERO-PCDNA6.....	94
III.1.6. EXPRESSION STABLE DE BOMX1 EN CELLULES VERO-PCDNA6	94
<i>Etablissement d'une population polyclonale stable.....</i>	<i>94</i>
<i>Clonage de VeropcDNA6/pcDNA4-boMX1.....</i>	<i>94</i>
<i>Sous-clonage de VeropcDNA6/pcDNA4-boMX1.....</i>	<i>95</i>
<i>Recouvrement de l'expression de BoMX1.....</i>	<i>95</i>
III.1.7. IDENTIFICATION PAR WESTERN BLOT ET IMMUNOMARQUAGE	97
III.1.8. TEST CINETIQUE DE L'EXPRESSION DE BOMX1	98
III.1.9. ABSENCE D'UN EFFET CYTOTOXIQUE DE LA PROTEINE BOMX1	101
III.2. FONCTION ANTIVIRALE DE BOMX1 VIS-A-VIS D'UN VESICULOVIRUS	102
III.2.1. INTRODUCTION	102
III.2.2. INHIBITION DE LA REPLICATION DU VSV	102
« Virus plaque assay ».....	102
"Virus yield reduction assay"	104
III.3. FONCTION ANTIVIRALE DE BOMX1 VIS-A-VIS D'UN RESPIROVIRUS, LE BOPI3	106
III.3.1. INTRODUCTION	106
III.3.2. PROTECTION ANTIVIRALE PAR L'EXPRESSION DE BOMX1	106
<i>Titration directe.....</i>	<i>106</i>
<i>Immunofluorescence.....</i>	<i>106</i>
<i>Test MTS.....</i>	<i>107</i>
<i>Cytométrie en flux.....</i>	<i>107</i>
<i>Titration indirecte.....</i>	<i>107</i>
III.4. FONCTION ANTIVIRALE DE BOMX1 VIS A VIS D'UN PNEUMOVIRUS, LE BORSV	112
III.4.1. INTRODUCTION	112
III.4.2. PROTECTION ANTIVIRALE PAR L'EXPRESSION DE BOMX1	112
<i>Titration directe.....</i>	<i>112</i>
<i>Test MTS.....</i>	<i>112</i>
<i>Immunofluorescence</i>	<i>113</i>
<i>Titration indirecte.....</i>	<i>113</i>
III.5. ACTIVITE ANTIVIRALE DE BOMX1 VIS-A-VIS D'UN ORTHOMYXOVIRUS, L'INFLUENZA A.....	118
III.5.1. INTRODUCTION	118
III.5.2. CINETIQUE D'EXPRESSION DU VIRUS INFLUENZA A H1N1 EN CELLULES VERO	119
III.5.3. PROTECTION ANTIVIRALE PAR L'EXPRESSION DE BOMX1	120
<i>Inhibition du virus Influenza A H1N1 par l'expression transitoire de BoMX1 en cellules Vero</i>	<i>120</i>
<i>Titration directe.....</i>	<i>122</i>
<i>Immunofluorescence.....</i>	<i>122</i>
<i>Titration en retour.....</i>	<i>125</i>
III.6. ETUDE DE L'INHIBITION DE LA SYNTHÈSE D'ARN VIRAUX.....	127
III.6.1. INTRODUCTION	127
III.6.2. RT-PCR SEMI-QUANTITATIVE	127
III.7. ANALYSE PAR NORTHERN BLOT.....	129

III.7.1. Préparation des sondes	129
III.8. QRT-PCR.....	136
III.8.1. Introduction.....	136
III.8.2. Données de la qRT-PCR.....	136
III.9. ANALYSE DES RIBONUCLEOPROTEINES VIRALES ENTRANTES PAR REACTION D'EXTENSION D'AMORCES.....	138
III.9.1. Introduction.....	138
III.9.2. Expériences préliminaires	138
<i>Mise en évidence de l'effet inhibiteur de BoMX1 sur les RNA viraux.....</i>	<i>139</i>
III.10. INTERACTION POTENTIELLE DYNAMINE 2 ET BOMX1	143
III.10.1. Introduction	143
III.10.2. Dynamine 2 et BoMX1.....	143
IV. DISCUSSION.....	147
IV.1. INTRODUCTION	147
IV.2. ETUDE DE L'INHIBITION DE DIFFERENTS VIRUS PAR L'EXPRESSION DE BOMX1.....	147
IV.2.1. LA LIGNEE INDUCTIBLE V103	147
IV.2.2. BOMX1 ET LE VSV	148
IV.2.3. BOMX1 ET PARAMYXOVIRIDAE.....	148
<i>BoMX1 et le virus Parainfluenza de type 3 bovin (BoPI3).....</i>	<i>148</i>
<i>BoMX1 et le virus respiratoire syncytial bovin (BoRSV).....</i>	<i>149</i>
IV.2.4. BOMX1 ET ORTHOMYXOVIRIDAE	149
IV.3.MECANISME D'INHIBITION DU VIRUS INFLUENZA A PAR BOMX1.....	151
IV.3.1. Introduction	151
IV.3.2. BoMX1 et l'ARN viral	153
IV.3.3. Inhibition des ribonucléoprotéines entrantes.....	154
IV.3.4. Interaction potentielle avec la dynamine2.....	154
IV.4. CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	156
BIBLIOGRAPHIE.....	160

I. Introduction

GÉNÉRALITÉS

I.1.1. LA SUPERFAMILLE DES DYNAMINES

GENERALITES

Les dynamines forment une superfamille de protéines de masse importante (>60000 Da) présentant une activité GTPasique. Ubiquistes chez les organismes eucaryotes, on distingue les dynamines proprement dites, les protéines de type dynamines (dynamin-like), OPA1 (protéine 1 de l'atrophie optique ou *Optic Atrophy 1*), les protéines MX, les mitofusines et l'atlastine dont certaines formes mutées sont responsables de la PSF (*Paraplégie Spastique Familiale*). Elles sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires parmi lesquels le bourgeonnement des vésicules de transport, la division des organelles, la cytokinèse et la résistance à certains pathogènes (immunité innée). La connaissance des génomes complets de différentes espèces (*Homo sapiens*, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana*...) permet d'obtenir une vue d'ensemble de l'évolution et de la persistance des gènes de cette superfamille au cours de l'évolution.¹

STRUCTURE

En dépit de leur implication plurielle dans la physiologie cellulaire, la structure générale des dynamines se caractérise par un schéma de base similaire. Cinq domaines principaux sont identifiés : "Dynamin-N" ou domaine GTPase, "Dynamin-M" ou domaine central, PHD ou "*Pleckstrin Homology domain*", le GED ou "*GTPase Effector Domain*" et PRD ou « *Proline Rich Region* » (Fig.1). Les caractéristiques architecturales minimales communes à tous les représentants de la superfamille consistent en (i) l'important domaine globulaire GTPasique (plus de 300 acides aminés), (ii) le domaine intermédiaire et (iii) le GED, ces deux derniers étant impliqués dans la formation de la structure quaternaire (oligomères) et dans la régulation de l'activité GTPasique.

Domaine GTPase

La structure du domaine GTPase, le plus conservé chez les dynamines, a été déterminée à la résolution du 2.3 Å pour la dynamine A de *Dictyostelium discoideum*. La structure globulaire est constituée de 8 chaînes β (B-sheet) contre 6 chez les autres familles fixatrices du GTP. Cette extension particulière topologiquement définie est caractérisée par l'insertion de 55 acides aminés (Fig.2). L'hélice N-terminale interagit avec la partie C-terminale du domaine et forme une gorge. Aucun changement remarquable de conformation n'est décelable entre la forme libre et la forme liée au GDP, suggérant que les modifications sont associées à la fixation du GTP et/ou à son hydrolyse ou à la libération du produit de la réaction (phosphate inorganique).

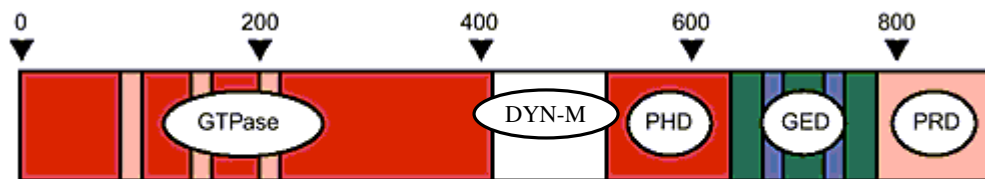


Fig.1. Structure générale des dynamines. Le domaine GTPase qui comprend un site de fixation tripartite (bandes roses) s'étend sur 400 acides aminés (le curseur « ♥ » indique la position sur la séquence protéique). La partie centrale ou DYN-M est conservée mais sa fonction est encore mal définie. Elle précède le PHD ou « *Pleckstrin Homology Domain* » qui possède une affinité pour l'inositolphosphate. Il est absent chez les protéines « *dynamine-like* ». Le GED est le « *GTPase Effector Domain* » dont l'interaction avec la partie N-terminale stimule l'activité GTPase. Enfin, le « *Proline Rich Domain* » ou PRD est capable de fixer les protéines telles que les amphiphysin-1 et -2.

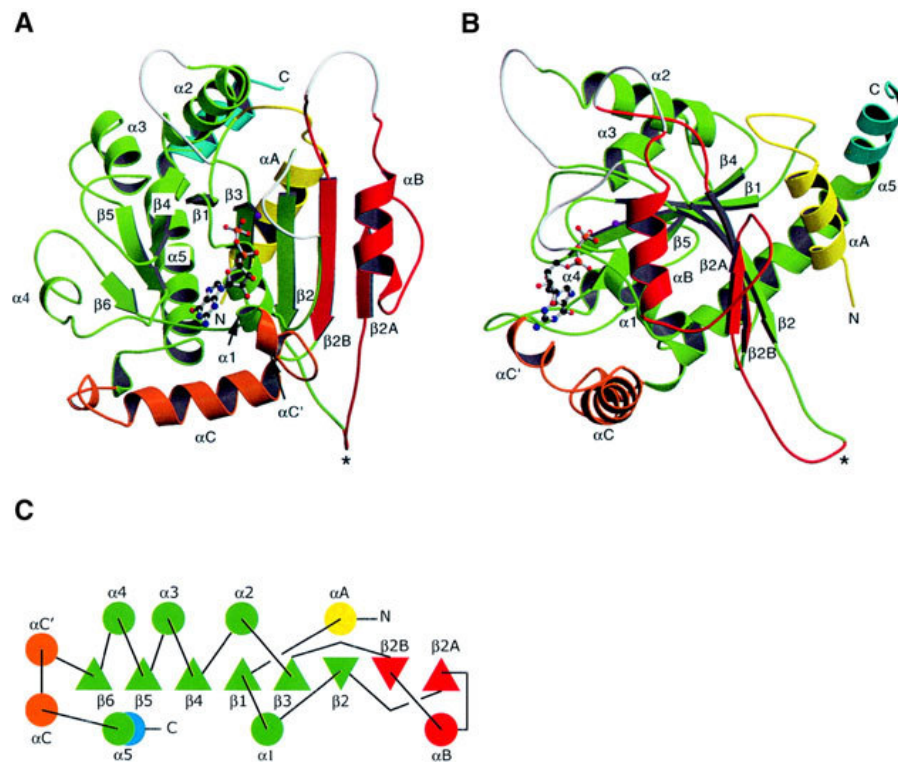


Fig. 2 . Topologie et structure du domaine GTPase des dynamines.

L'insertion caractéristique des dynamines est présentée en rouge (chaines $\beta 2A$, hélice αB et $\beta 2B$) ; la partie commune avec le cœur des protéines G, en vert.

(A) Vue de face. Les chaines sont au nombre de 8. (B) Vue latérale. αA et αB sont proches des feuillet β tandis que hélice αC s'étend perpendiculairement à ceux-ci ; αA et $\alpha 5$ entrent en contact à l'arrière du domaine. (C) Représentation topologique : les triangles dont les pointes sont orientées vers le haut représentent les chaines β au-dessus du plan ; ceux vers le bas sont en-dessous du plan. D'après Niemann *et al.*²

Domaine central

Le domaine central se situe entre le domaine N et le domaine PHD. Son étude n'a pas encore permis de lui attribuer une fonction définie. Il est pourtant bien conservé entre les espèces animales et végétales ainsi qu'en atteste l'alignement de séquences présenté ci-après (Fig.3). Remarquons que peu d'informations de structure sont disponibles sur ce domaine central.

Domaine PHD

Il en est tout autrement du domaine PHD ou "*Pleckstrin Homology Domain*" constitué d'une centaine d'acides aminés. Présent chez les vertébrés, la *Drosophila*, *C.elegans* et les levures, il est généralement retrouvé chez les enzymes possédant une

fonction régulatrice importante.^{3,4} Corollairement, les formes mutées sont souvent associées à l'oncogenèse et aux désordres du développement.⁵ Bien que présentant un degré de conservation des séquences peu élevé, il est défini par une architecture commune qui se caractérise par sa polarisation électrostatique. Les fonctionnalités associées à ce domaine sont multiples. Relevons en particulier l'interaction spécifique avec les protéines de la membrane cytoplasmique, et, dans certains cas, une affinité élevée pour les lipides ; l'inositolphosphate fait également partie des divers ligands du domaine PHD.^{6,7} La spécificité des liaisons est assurée au niveau de boucles de la partie N-terminale qui se découvre la plus variable. Chez les protéines dénommées "dynamin-like", le domaine PHD est le plus souvent absent.

La structure cristallographique de la version humaine du domaine est disponible à la résolution de 2.3 Å (Fig. 4). La molécule est constituée de deux feuillets beta antiparallèles disposés orthogonalement et « fermés » d'un côté par une hélice α amphiphile. La correspondance avec d'autres structures cristallographiques ou déduites d'expérience NMR est très bonne si ce n'est la dimérisation qui semble ici particulière.


```

*          20          *          40          *          60          *          80
DYN1_HUMAN : ARDVLENKLLPLRRGYIGVNVNRSQKDDIGKKDITAAALAEERKFFLSHPSYRHLADRMGT--PYLQKVLNQQLTNHIRDITLP : 79
DNM1L_HUMA : AMDVLMGRVIVPKLGIIGVNVNRSQLDINNKKSVDTSIRDEYAFLLQKK--YPSLANRNGT--KYLARVTLNRLLMHHRIDCLP : 77
DYN_DROME/ : ARDILENKLLPLRRGYIGVNVNRSQKDIYGRKDIHQALAEERKFFLSHPSYRHMADRLLGT--PYLQVRLNQQLTNHIRDITLP : 79
Q28379_HOR : VVDVVRNLLCHLKKGYMIVKCRGQQDIDQLSLAEALQREKAFPEENPYFRGLLEBEGRASVPCLAERLITPELITHISKSLP : 81
MX1_BOVIN/ : VVDVVRNLLVFLKKGMYIVKCRGQQDIDKHRMSLDKALQREIRIFFEDHAFRDLEBEGKATIPCLAEERLITSELMHICKTLP : 81
DRP3A_ARAT : ARKILLGNVPLRLGYIGVNVNRCQEDILLNRTVKEALLAEKFFRSHPVYHGLADRLGV--PQLAKKLNQILVQHKVLLP : 79
DYN1_CAEEL : AREILENKLLPLRRGYIGVNVNRSQKDIYGRKDIRAALDAERKFFISHPSYRHMADRLLGT--SYLQHTLNQQLTNHIRDITLP : 79
YB68_SCHPO : AMDILSGRVYPLKLGIVATVNRSDIVSHKSMRDALQERSFPEHHPAYRTIKDRCCGT--PYLAKTLLNLLVSHIRERLP : 79
DNM1_YEAST : ALDILSGKMYPLKLGIVGVNRSQDIDQLNKTVESLDEKEDYFRKHPVYRTISTKCGT--RYLAKLLNQTLVSHIRDKLP : 79
Q94464_DIC : AMEVLTRGVYPLTGLGIVGIVNRSQEDIIAKKSIRESLKSEILYFNHHPYIKSIANRSQT--AYLSKTLNKLMLPFHIRDITLP : 79
VPS1_YEAST : VIDILAGRVYPLRYGYIPVINGRQKDIYHKKTIIRALENERKFFENHPSYSKKAHYCGT--PYLAKKLNILLHHRIDITLP : 79
DRP1A_ARAT : AVEILLEGRSFKLKYPWVGVNRSQADINKVMDIAARKREBYFSNTTEYRHLANKMG3--EHLAKMLSKHLERVIKSRIP : 79
ARDILEGRVFPPLKLGIVGVNRSQKDIQGGKSIREALQAEKFFESHPSYRHLADRLGTISPYLAKTLNQQLTNHIRDITLP

*          100         *          120         *          140         *          160
DYN1_HUMAN : GLRNKLSQSLLS+EKEVEEYKNER-PDDPAKTKALLQMVQQAADFVDEKRIEBSG-DQIDTYELSGGARINRIFHERFPFE : 158
DNM1L_HUMA : BLKTRINVLAAQYQSLNLSYG----EP-VDDKSAATLQLLITKFAFECNTIEBGA-KYLETSELCCGGARICYIFHEPFGRT : 152
DYN_DROME/ : GLRDILKQKMLTLEKEVEEYKHFQ-PGDASIKTKANLQMIQQYQSDHFEITIEGSGSALVNTNELSGGAKNRIIFHERIRFE : 159
Q28379_HOR : LLENQIKESYQNLSDLELQKYGTDI-PEDETEKTFLLVVKITTFNQNTSFFVQGBE--LVGPNDRLENKIRQEPQKWSGVI : 159
MX1_BOVIN/ : LLENQIKETHQRITTELELQKYGKDI-PEEESRKMFCLETKIDTFNKELISTIEGEBE--FVQYDRLRFTKVRAPESKWSAVV : 159
DRP3A_ARAT : DLKSRISNALVATAKEHQSYGELT-ES-RAGQCALLNLELSKCEAYSSLEEGKS-EMSTSELGGARHYIFQSIYVKS : 157
DYN1_CAEEL : TLRDSLQKMFAMEKDVAEYKNYQ-PNDPGRKTKALLQMVQPNADIERSEIEGSSAKLVSTNELSGGARINRIFHERFPFE : 159
YB68_SCHPO : DIKARLSTLISQTOQQQLNNYGFK-LSDSQSRQIILLQAMNRFANTFIASIDGNS-SNIPTKELSGGARISYIFNNVFTTA : 158
DNM1_YEAST : DIKTKLNTLISQTEQLARLYGGVG-ATNESRASLVQLMKNKFTNFISSIDGTS-SDINTKELCCGARIYIYNNVFNMS : 158
Q94464_DIC : DLKVVVSKMLSDVQVGLSTYGDPL-YDTKNSOGALLQIITIPSSNPKDAIDGKL-TDLSNNELYGGARISYIFNEIYSHC : 158
VPS1_YEAST : BTKAKIEATLKKYQNELINLG----PETMDSASSVLSMITDFSNBYAGILDGEA-KELSSQELSGGARISYVPHETPKNG : 155
DRP1A_ARAT : GIQSLINKTVLELETLRSRLGKPT-AADAGGKLYSIMEICRLPDIKFEHLDGVR-----AGGEKVVNVFNDQLPAA : 150
DLKNIQKTLSQLKELQYGNFI PEDESSKTAALLQMITKSSDFESTIEGSSAKLITNELSGGARINRIFHERFPFE

*          180         *          200         *          220         *          240
DYN1_HUMAN : LVKMEF--DEKELRREISYAIKNIHGIRTLGLETPDMAFETIVKQVKKIREPCLKCVDNVISELISVTRQCT----KRLQQ : 233
DNM1L_HUMA : LEVSDP--LGGLNTIDILTAIRNATGPRPALVPEVSPFELLVKKQIKRLEBPSLACVELVHBEQMRTIQHCSNYSTQELLR : 231
DYN_DROME/ : IVKMAC--DEKELRREISFAIRNIHGIRVGLTVPDMAFEAIVKQIALLKEFPVVKCVDLVVOELSVVRMCT----AKMSR : 234
Q28379_HOR : ENNFRK--GGEATRRQIWTPENQYRGRLEPQFVNYRTFETIIKQIQIQLLEBPAIDMLHRSIDLVRDFTTKVS---EKNFSE : 235
MX1_BOVIN/ : EKNFEK--GYEATRKEIKQEPENRYRGRLEPQFVNYRTFETIIKQVVRLEBPVDMHLHTVTDIIRNFTTIVS---GKHNE : 235
DRP3A_ARAT : LEEDVP--CEDLDDDIRTAINATGPRPALVPEVSPFVLRVRRQISRLLEDPSLQCARFIFELIKIHRCCM----MNELQR : 233
DYN1_CAEEL : IVKMI--DEKEMRKEIQYAIRNIHGIRVGLTVPDMAFEAIAKKQITRLKEBPSLKCVDLVVNELANVIRQCA----DTMAR : 234
YB68_SCHPO : LNSIDP--LQNLSTVDIRTAILNSTGSRATLFLSEMAFDILVKKQIINLLAAPCHQCVELVYBELMKICHYSG---DSDISH : 234
DNM1_YEAST : LKSIDP--TSNLSVLDVIRTAIRNATGPRPTFLVPEVAFDILLVKKPQIKLLEBPSQCVELVYBELMKICHYCG---SABELAR : 234
Q94464_DIC : VNNIDP--LEGISLNDIRTMRNATGPRPALVPEVSPFELLVKKQVVRLEBPSAQCVYVYDELQRIVSQLE---AKELSR : 234
VPS1_YEAST : YDSDLP--FDQIKSDIRTIMYNSGSAFPLVGTGEAFVLVKQVIRRFEEBPSLRIVTLVFDLVLVRLKQII---SQPKYSR : 232
DRP1A_ARAT : LKRLQF--DKQLAMDNIIRKLVTEADGYQPHLTAPEQGYRRLIESIIVSIRGPAAEASVDTVHAHLKDLVHKSVN--ETVELKQ : 228
LKSIDP DEKLSRRDIRTAIRNATGPRPALVPEMAFELLVKKQIKRLEBPSLKCVELVYBELMKIVHCSNYSTKELSR

*          260         *          280         *          300
DYN1_HUMAN : YPRLREEMERIVTTHIREREGRTKEQVMLLIDIELAYMNTNHDFDIFGFANAQQRNQMNKK : 294
DNM1L_HUMA : FPKLRDAIVEVVTCLLRKRLPVTNEMVHNLVAIELAYINTKHDFADACGLMNNIEEQRR : 292
DYN_DROME/ : YPRLREETERIITTHVRQREHSCKEQIILLIDFELAYMNTNHDFDIFGFANAQNKSENANKT : 295
Q28379_HOR : FPNLHRTTFSKLEDIKLEQENEAESKSIIRLHFQMEKIVYQCDHVIYRGTLQKVRNEMEEBKK : 296
MX1_BOVIN/ : FPNLHRTAFSKIIDIRLEQENEAESKSIIRLHFQMEKIVYQCDQVYRRALQVREKBAEENK : 296
DRP3A_ARAT : FVPLRKRMDVEIGDELREGLEPSEAMIGDIIDMEMDYINTSHPNFIGTKAVEAMHQVKS : 294
DYN1_CAEEL : YPRLRDELEIRIVVSHMREREQIAKQIIGLIVDYELAYMNTNHDFDIFGFANAQAKASQGGSA : 295
YB68_SCHPO : FPKLQTYALVTVSDLLRENITPTYSFVESLIAIQSAYINTNHDFDIFGVQCAMAVVLS-FKE : 294
DNM1_YEAST : YPKL*SMLEIVISELLRERLQPTRSYVESLIDIHRAVINTNHDFL*ATEAMDDIMKTRRK : 295
Q94464_DIC : FPNL*ARVIEVNVNLLQKHKVPTKTMIEHLIKIETAFINTSHPDFVSGEIGFESLYKKQQL : 295
VPS1_YEAST : YPALREAI*SNQFIQFL*DATIPTHEFVVDII*AEQY*INTAH*PDL*LRG*SQAMVM*VEEK*LHP : 293
DRP1A_ARAT : YPALRVEV*NAAI*ESLDMR*GSK*ATI*QLVD*NEC*SYL*PVD--*F*FR*KL*PQD*VEK*GGN*P*HS : 287
FPKLRDELEEVVTDLLREREQPTKEMIELLIDIELAYINTNHDFDIFGLQQAEMKAMEBQK

```

Fig. 3 : Alignement du domaine central (Dynamine-M). Différentes dynamines appartenant à des espèces animales et végétales sont alignées versus l'isoforme 1 de la dynamine-1 humaine. Les acides aminés conservés apparaissent en **bleu**, les moins conservés en noir. Le pourcentage d'identité de séquence permet de dégager une séquence consensus (en bas et en noir). DYN1_HUMAN : dynamine 1 humaine ; DNMI : dynamine-related protein 1 humaine ; DYN_DROME : dynamine 1 de dromadaire ; Q28379-HOR : MX du cheval ; MX1_BOVIN : MX1 de la bête bovine ; protein ; DRP3A_ARAT: Dynamine-related protein 3 d'*Arabidopsis thaliana*; DYN1_CAEEL : dynamine 1 de *Caenorhabditis elegans* ; YB68_SCHPO : Dynamine-related protein 1 de *Schizosaccharomyces pombe* ; DNMI_YEAST : Dynamine-related protein 1 de la levure ; Q94464_DIC : dynamine A de *Dictyostelium discoideum* ; VPS1_YEAST : vacuolating protein sorting 1 de levure ; DRP1A_ARAT : Dynamine-related protein 1 d'*Arabidopsis thaliana*.

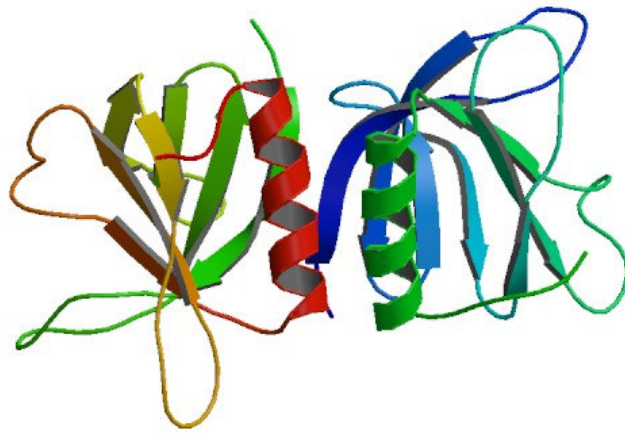


Fig.4. Structure globale du domaine PHD ou « *Pleckstrin Homology Domain* ». Deux feuillets beta antiparallèles disposés orthogonalement définissent un « sandwich » moléculaire. Un des côtés est occupé par l'hélice α C terminale. Les boucles, peu conservées entre les différentes protéines possédant ce domaine, forment des surfaces chargées positivement responsables de la spécificité de l'interaction (d'après Fergusson et al.).⁸

GED

Le GED ou "GTPase effector domain" s'étend entre le domaine PHD et les régions riches en proline et en arginine de la partie C-terminale. Cette partie de structure hélicoïdale interagit avec la partie N-terminale pour en stimuler l'activité GTPase.⁹ A son tour cette interaction favorise la formation d'oligomères lesquels stimuleraient l'activité GTPase. La formation de la structure quaternaire concerne le domaine GTPase, le domaine central et le GED, lesquels constituent l'armature de base de la superfamille des dynamines qui est complétée par des domaines possédant un rôle de ciblage : le PHD que nous venons de décrire ; le PRD ou *Proline Rich Domain* - domaine riche en proline qui fixe les régions de type SH3 - ou encore par des séquences qui sont des signaux de localisation reconnaissant les mitochondries, les chloroplastes¹...

L'alignement de séquences de diverses espèces et de différentes dynamines montrent que ce domaine est relativement peu conservé. A l'heure actuelle, les données de structure relative à ce domaine restent très fragmentaires.

```

                *           20           *           40           *
MX1_bos      : SSIS-SIVEIGVHLNAYFMETSSKRLANQIPFIIQYFMLQENGDKVQKAMMQLLQDT : 55
DNM1L_Homo  : -REQRDCEVIERLIKSYFLIVRKNIQDSVPKAVMHFLVNHVKDTLQSELVGQLYKS : 55
DynT_homo   : -QLERQVETIRNLVDSYMSIINKCIRDLIPKTIMHLMINNVKDFINSELLAQLYSS : 55
MX1_canis   : -SVNISLSEILEHLLAYRQEATNRISSHIPLIIQYFILQVYGQKLQNGMLQLLQDK : 55
Dyn2__ratt  : -QLERQVETIRNLVDSYVAIINKSIRDLMPKTIMHLMINNTKAFIHHELLAYLYSS : 55
DNML_Sacch  : -REELECELIKRLIVSYFDIIREMIEDQVPKAVMCLLVNYCKDSVQNRLLVTKLYKE : 55
Dyn1_Kluyv  : -REELECELIRRLIVSYFSIVREMIEDQVPKAVMCLLVNYSKESVQNRLLVTKLYKE : 55
dyn?_Monod  : -QLERQVETIRNLVDSYMAIVNKTIRDLMPKTIMHLMINNTKDFIHSELLANLYSC : 55
VPS_ssacch  : -REKTDTEVIKLLIMSYFNIVKRTLADMVPKSISLKMIKYSKEHIQHELLEQLYKS : 55
                e I 16 sY i 6 6Pk 6 66 k 6 66 Ly

                60           *           80           *
MX1_bos      : QHYSWLLQEQSDTATKRKFLKEKIFRLTQAQQALYEF : 92
DNM1L_Homo  : SLLDDLLTESEDMAQRRKEAADMLKALQGASQITAEI : 92
DynT_homo   : EDQNTLMEESAEQAQRRDEMLRMYQALKEALGIIGDI : 92
MX1_canis   : DTYSWLLKERSDTSDKRKFLKERLARLAQARRRLAKF : 92
Dyn2__ratt  : ADQSSLMEESAEQAQRRDDMLRMYHALKEALNIIGDI : 92
DNML_Sacch  : TLFEELLVEDQTLAQDRELCVKSLSGVYKKAATLISNI : 92
Dyn1_Kluyv  : SLFDELLMEDQTLAQDREKCVNLLETYQKASGIIGDI : 92
dyn?_Monod  : GDQNTLMEESAEQAQRRDEMLRMYH----- : 80
VPS_ssacch  : QAFDKLLQESEVTVQRRKECEQMVESLLQASEIVSNV : 92
                L6 E aq R a

```

Fig.5 : Alignement du domaine effecteur (GED) de dynamines d'espèces et de types différents. Les acides aminés conservés apparaissent en bleu, les moins conservés en noir. Remarquons l'absence d'une séquence consensus définie (dernière ligne). MX1_bos : MX1 de la bête bovine ; DNM1L_Homo : Dynamine-1-like humaine ; DynT_homo : Dynamine T (testiculaire) humaine ; MX1_canis : MX1 du chien ; Dyn2_ratt : dynamine 2 du rat brun ; DNML : dynamine-like de *Saccharomices cerevisae* ; Dyn1_Kluyv : dynamine 1 de *Kluyveromyces lactis* ; Dyn ?_Monod : dynamine non déterminée de l'opossum (*Monodelphis domestica*) ; VPS_ssach : « Vacuolar Protein Sorting » de *Schizosaccharomyces pombe*.

PRD

La région PRD ou « *Proline Rich Region* » s'étend sur une centaine d'acides aminés. Sa dénomination n'est pas usurpée puisque sa composition en proline dépasse les 30%. L'arginine, l'alanine, la glycine et la sérine sont bien représentées (environ 10% pour chacun de ces résidus) ; le point isoélectrique de ce domaine est résolument basique (pI théorique = 12). L'interaction de cette région avec le « Src (*Steroid receptor co-activator*) homology 3 domain » ou SH3 de différentes protéines est fort bien documenté. Ce domaine de petite taille (60 résidus) se retrouve au sein de protéines impliquées dans de nombreuses fonctions biologiques telles que l'organisation du cytosquelette, le déplacement des vésicules, ou l'assemblage des organelles. L'interaction du domaine avec son ligand donne naissance à un motif particulier : l'hélice poly-proline gauche de type II (PPII). Seules, les dynamines dites

classiques possèdent cette région PRD. Parmi les interactions les plus fortes, relevons celle qui concerne l'amphiphysine, elle-même associée à la clathrine, aux adaptateurs AP2 et aux membranes.¹⁰ L'association des dynamines aux CCPs (Clathrin-coated pits) de la membrane cytoplasmique serait réalisée par ce biais.



Fig.6 : Interaction d'une région riche en proline avec un domaine SH3. La formation d'une hélice gauche au niveau d'un domaine riche en proline (représenté en jaune) est le résultat de son interaction avec le domaine SH3. D'après Lewitzky M et al.¹¹

CLASSIFICATION DES DYNAMINES

Sur base des éléments structuraux décrits, il est possible de classer les dynamines en trois groupes principaux : Les dynamines classiques, les protéines de type dynamines (dynamain-like) auxquelles sont également associées des protéines fixatrices du guanylate ou GBP (*Guanylate Binding Protein*).

Tableau 1. Classification de la superfamille des dynamines.

Groupes	Protéines types (numéro d'accension)	Nombre de domaines	Domaines absents	Domaines ou séquences spécifiques
Dynamine classique	Dynamine 1 (NP_001399) Dynamin3 (NP_Q9UQ1)	5	---	---
Type dynamine ou "dynamin-like"	Dlp (NP_0.36192)	4	PRD	---
	MxA (NP_002453)	3	PH + PRD	---
	Mitofusin1 (NP_284941)	3	PH+PRD	---
	OPA1 (Q60313)	4	PRD	Localisation mitochondriale + domaine trans-membranaire
Type GBP	GBP1 (NP_002044)	3	PH+PRD	
	Atlastin 1 (NP_056999)	2	GED+ PH+PRD	Domaine trans-membranaire

Les dynamines classiques

La dynamine 1 mammalienne est particulièrement exprimée au niveau du cerveau où elle se concentre au niveau des synapses ; l'isomorphe 2 est ubiquiste ; la dynamine 3 est principalement rencontrée au niveau des testicules et au niveau du système nerveux central, plus spécifiquement dans les régions post-synaptiques.

Sur le plan fonctionnel, les formes 1 et 2 sont essentielles pour la scission des vésicules à clathrine (*Clathrin coated vesicles* ou CCVs)¹². Leur rôle est également reconnu dans l'internalisation des caveolae,^{13,14} dans la phagocytose,¹⁵ la formation de podosomes¹⁶, lors de la cytokinèse,¹⁷ les modifications des réseaux d'actine, contribuant ainsi à la plasticité du cytosquelette...

Les protéines de type dynamine ou "dynamin-like proteins"

Ces dynamines ne possèdent pas de PRD. Tous les organismes, de la levure à l'homme, expriment une protéine homologue de "Dlp1" dont l'implication dans le processus de division mitochondriale est confirmée.^{18,19} A l'instar d'autres dynamines, cette protéine forme des oligomères qui s'organisent en anneau et sont capables d'interagir avec les membranes²⁰. Si le rôle essentiel de Dlp1 dans la division des

organelles a été clairement établi, il apparaît de plus en plus partagé avec d'autres homologues précédemment cités, tels que OPA-1 et la mitofusine.^{21,22,23,24,25}

Parfois les molécules se sont davantage spécialisées. Ainsi, la protéine MX humaine – MXA - son isomorphe MXB et leurs homologues identifiés chez les mammifères et les poissons sont un exemple de spécialisation fonctionnelle. Induite par les interférons de type I, le seul rôle qui, à ce jour, a pu lui être clairement attribué est celui de protection contre l'infection virale²⁶. A ce titre, MX est un élément de première force dans l'arsenal de l'immunité innée. Ces protéines sont très conservées d'un point de vue structural. Elles se caractérisent par l'absence du domaine PHD et de la région PRD. Leur description sera détaillée dans la suite de cette introduction.

Classées dans le groupe des protéines de type GBP, dernier de la superfamille, les atlastines possèdent un domaine GTPase et une région centrale mais elles sont dépourvues des autres éléments. Leur séquence C-terminale est caractérisée par la présence de domaines transmembranaires successifs. L'atlastine-1, principalement rencontrée au niveau des neurones pyramidaux du cortex cérébral et de l'hippocampe, est associée au Golgi et semble indispensable à l'intégrité des cellules nerveuses²⁷; des mutations du gène codant pour l'atlastine sont associées à une maladie neuro-dégénérative familiale, la paraplégie spastique.²⁸ Enfin, les GBPs proprement dites sont induites par les interférons de type II ; un rôle de résistance contre les pathogènes intracellulaires leur est également attribué sans que celui-ci ne semble pouvoir rivaliser avec celui des protéines MX.^{29,30} Il n'est pas inutile de préciser qu'une structure de GBP est disponible et constitue, en l'absence de données plus spécifiques, un modèle général préliminaire pour l'étude des interactions des régions GTPases, centrales et GED des dynamines (Fig.7).³¹

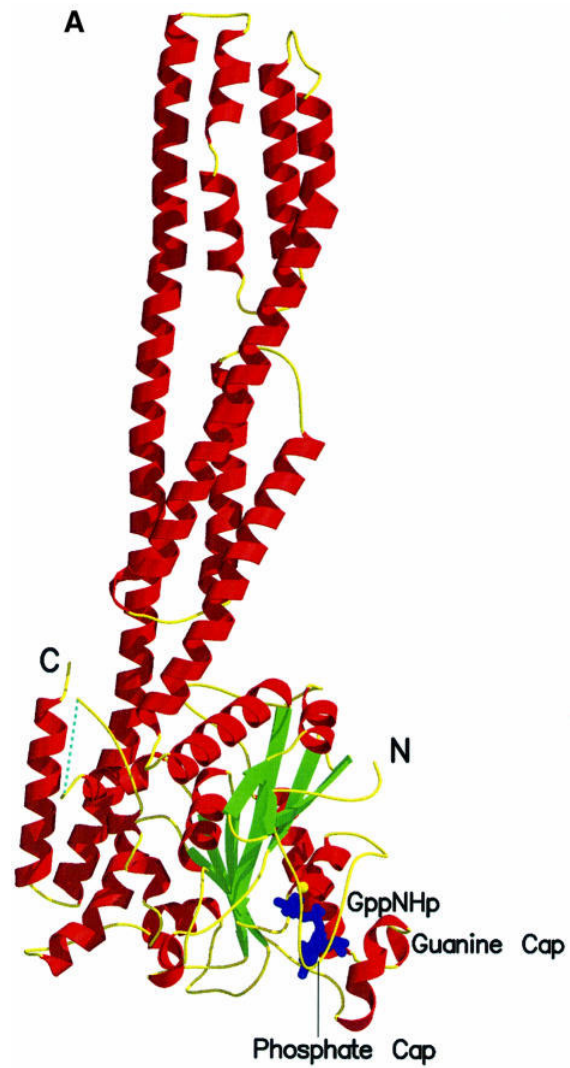


Fig 7. Structure générale de hGBP1. Représentation sous forme de ruban de la structure générale de la protéine ayant fixé un analogue non hydrolysable du GTP (en bleu) et un atome de Mg⁺⁺ (en jaune). La structure compacte du domaine GTPase et ses chaînes β contrastent avec la structure en hélice α , très étirée. En particulier, on remarquera le GED constitué d'une très longue hélice α dont l'extrémité C-terminale se retrouve à proximité immédiate d'acides aminés appartenant au domaine central.

I.1.2. INTERFERONS ET ACTIVITE ANTIVIRALE

REPONSE INNEE ET INTERFERONS

La première ligne de défense contre les infections virales développée par les organismes pluricellulaires est assurée par un ensemble de mécanismes appartenant à la composante innée de la réponse immunitaire. Celle-ci a pour raison d'être de limiter l'extension de l'infection au sein de l'organisme sans qu'une exposition préalable à l'agent pathogène concerné ne soit requise.

Parmi les systèmes protecteurs propres à l'immunité innée, le système "interférons"* est sans doute le plus puissant, le plus efficace dans la résistance aux infections virales³². Il comprend deux types principaux de molécules caractérisées par une structure primaire, des récepteurs membranaires spécifiques et des fonctions biologiques propres.

Les interférons de type I^{33,34} forment une famille de cytokines comprenant plusieurs membres. Chez les mammifères, au moins huit membres sont identifiés : ce sont les interférons (INFs) α , β , δ , ϵ , κ , ζ , τ et ω ^{35,36}. Les deux premiers, les INFs α et β sont présents chez tous les mammifères ; leurs propriétés qu'ils partagent avec les INFs ω et ζ , sont antivirales, immunomodulatrices antiprolifératives et apoptotiques. Par contre, l'INF δ n'est décrit ni chez le porc ni chez l'homme. Les autres classes sont décrites chez la plupart des espèces. Seul, l'interféron τ semble être spécifique des ruminants chez qui son rôle est associé au maintien de la gestation³⁷. Les fonctions des INFs δ , ϵ , κ sont moins connues ; leur activité est de type immunomodulatrice.

Les interférons de type II ou interféron-gamma (γ) forment un dimère qui se fixe à un récepteur hétérodimérique (INF γ R1-INF γ R2). La constante de dissociation de la liaison au récepteur est très faible, de l'ordre de 10^{-10} M³⁸. Cette liaison a pour conséquence l'activation d'une cascade JAK-STAT³⁹. Après fixation au récepteur, la phosphorylation de résidus tyrosine aboutit à la formation d'un dimère cytoplasmique ou "GAF" ("Gamma Activator Factor") capable d'agir au niveau nucléaire et d'activer la transcription de gènes par sa liaison à une séquence d'ADN spécifique⁴⁰ (Fig.8).

* Le terme *interféron* dérive de l'étude du phénomène dit d'*interférence* virale qui a conduit à sa découverte.

La transcription de nombreux gènes (>30) est sous la dépendance de la cytokine.⁴¹ Contrairement aux interférons α et β qui sont potentiellement exprimés par tous les types cellulaires, l'interféron γ n'est secrété que par certaines cellules du système immunitaire : les lymphocytes CD4+T helper (Th1), les cellules CD8+, les cellules T (γ et δ) et les cellules tueuses "NK"⁴². L'interféron de type II s'invite dans le système immunitaire spécifique en stimulant les cellules présentatrices de l'antigène ("*Antigen Presentating Cells*" ou "APC") ; il stabilise les cellules Th1 (stimulation autocrine). Ses propriétés sont antivirales, immunorégulatrices et anti-tumorales. (FIG.9).

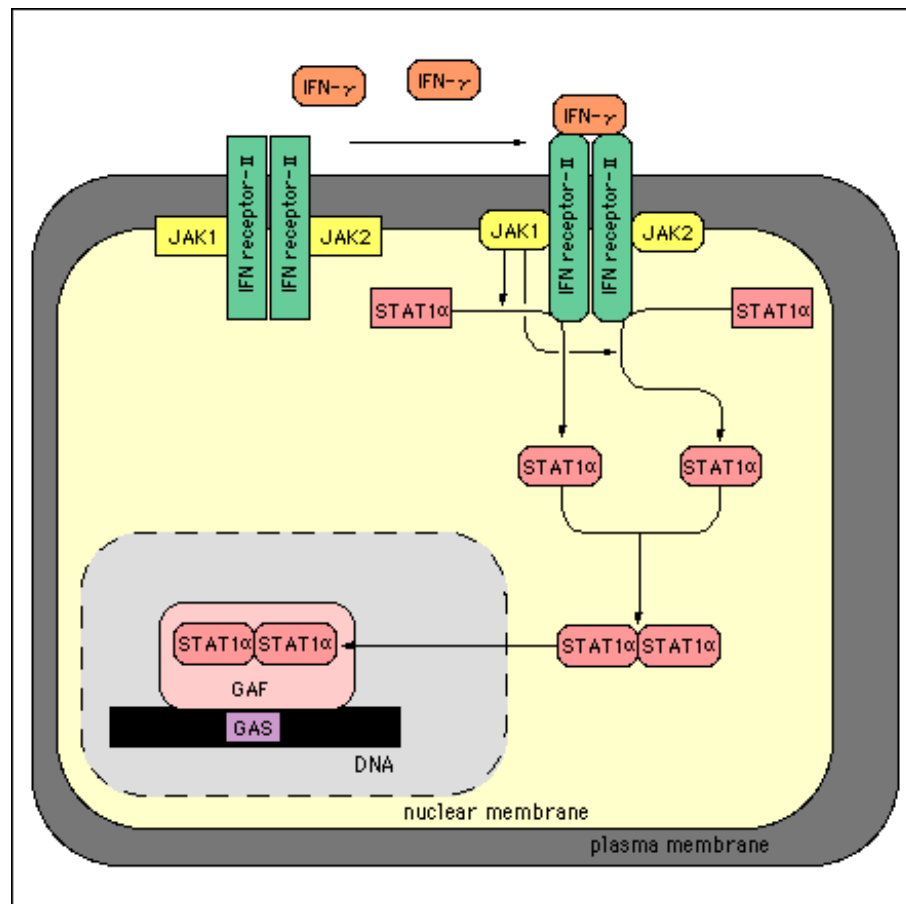


Fig 8. Schéma général de la cascade d'activation induite par la liaison de INF γ à son récepteur.

Les deux protéines JAK1 et JAK2 associées au récepteur sont activées par phosphorylation. A leur tour, les protéines Stat α sont phosphorylées et sont alors capable de former un dimère actif (GAF ou *Gamma interferon Activated Factor*) capable de pénétrer dans le noyau et d'interagir avec une séquence spécifique. L'élément nucléique cible (élément *cis*) est une séquence palindromique appelée "GAS" (*Gamma Activator Sequence*) de forme générale TTCN2-4GAA.

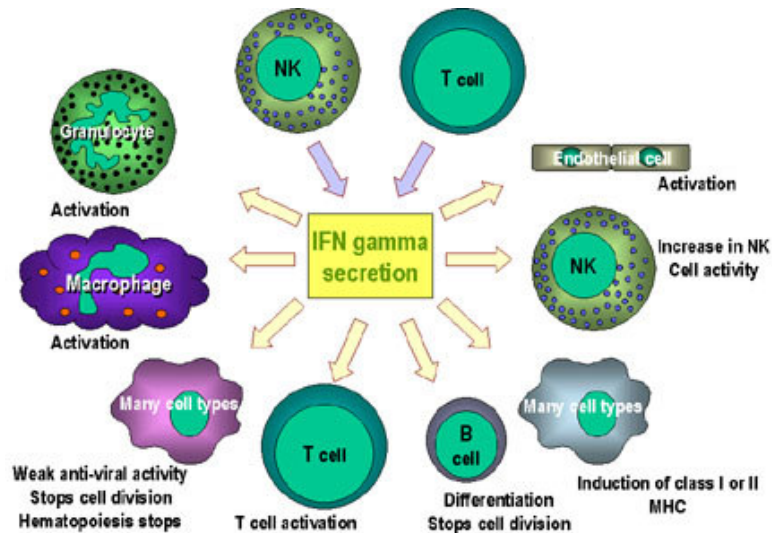


Fig. 9. Production et activité de l'IFN gamma. Secrété par les cellules NK et T (helper), son action est pleiotropique comme l'indique ses nombreuses cellules cibles ; ses fonctions générales sont immunorégulatrices, anti-tumorales et antivirales.

Enfin, mentionnons la découverte récente d'un troisième type d'interférons, les interférons λ qui comportent différentes classes (IL-28A, IL-28B et IL29)⁴³. Leur proximité avec les interférons de type I est évidente et se vérifie à travers leur fonction biologique de résistance à l'infection virale⁴⁴.

I.1.3. LES INTERFERONS DE TYPE I α/β

ORGANISATION GENOMIQUE ET PROTEIQUE

Chez l'homme, les gènes de type α/β sont co-localisés sur le chromosome 9 en position p22⁴⁵. De façon remarquable, l'organisation de ces gènes eucaryotes ne présente pas de séquence intronique^{46, 47} ; cette propriété est vérifiée pour toutes les espèces connues. En réalité, il existe plusieurs gènes IFN α - 13 chez l'homme - en nombre variable selon l'espèce^{48, 49}. L'identité de séquence intra-spécifique est élevée, de l'ordre de 95%. De façon contrastée, il n'existe qu'un seul gène IFN- β chez la plupart des espèces.⁵⁰ Les gènes codant pour les autres IFNs de type I sont présents en un seul exemplaire chez l'homme et la souris.

La masse des protéines interférons de type I est de l'ordre de 20 kDa. Les interférons α sont composés de 188-190 acides aminés y compris l'extrémité N-terminale et sa séquence signal de 23 acides aminés⁵¹. Des modifications post-traductionnelles sont observées en particulier chez les interférons β qui subissent une N-glycosylation limitée à un seul site chez l'homme (N80)⁵². Les interférons α ne sont pas nécessairement glycosylés : ici, la variabilité intra-spécifique et interspécifique est de mise. Le rôle biologique de la glycosylation ne semble pas primordial pour l'activité mais bien pour la stabilisation de la protéine⁵³.

La structure des interférons de type I est bien connue. Elle est largement conservée et se caractérise par la présence de cinq hélices α communes aux différentes classes. L'interféron β forme une structure dimérique qui s'organise autour d'un atome de zinc⁵⁴.

REGION PROMOTRICE DES INTERFERONS DE TYPE I α/β

Le promoteur du gène IFN- β comporte au moins quatre éléments de régulation en *cis* : les "Positive Regulatory Domains" ou "PRDs". PRDI et PRDIII sont activés par les membres de la famille des "IRFs" ou "Interferon Regulatory Factors" qui en comporte 9, tandis que PRDII et PRDIV le sont, respectivement, par le Nuclear Factor κ B (NF- κ B) et ATF-2/c-JUN^{55, 56, 57, 58}. Le promoteur de l'IFN- α contient un "PRD-Like Element" ou "PRD-LE" qui fixe certains "IRFs"^{59,60}. L'image actuelle de ce promoteur n'est probablement pas complète et laisse place à d'autres facteurs potentiels de transcription (Fig.10).

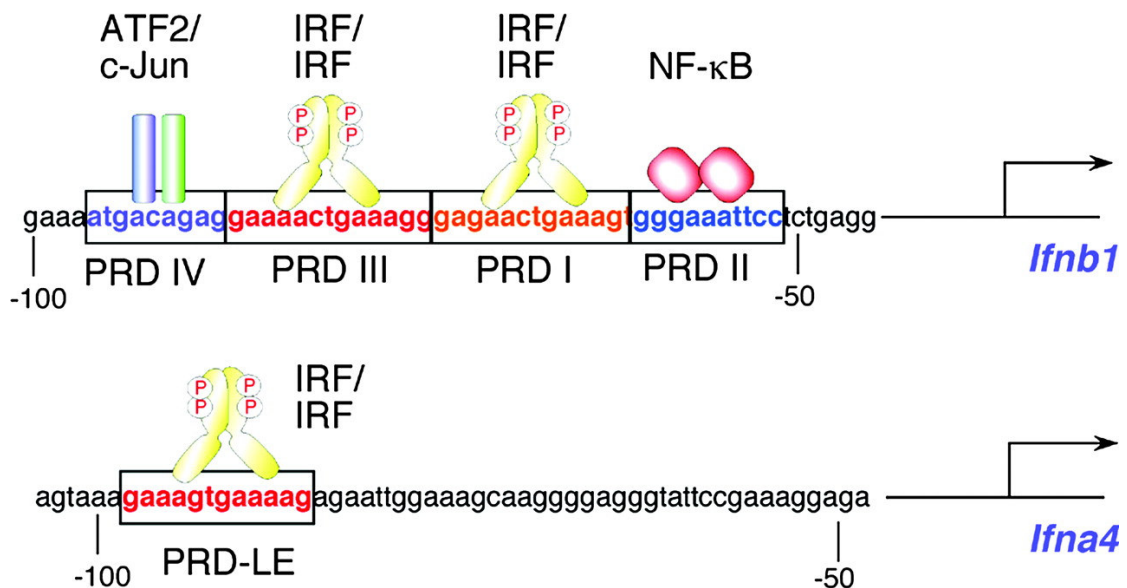


Fig.10 Représentation schématique de la région promotrice de l'IFN- β , en haut, et de l'IFN- α en bas. Les facteurs de transcription IRF, ATF2/c-JUN et NF- κ B se fixent aux régions PRD qui leur sont propres. Remarquons la présence d'un seul PRD (PRD-LE) identifié au niveau du promoteur des IFNs- α . (D'après Honda K. et *al.*)⁶¹.

I.1.4. INFECTION VIRALE ET INDUCTION DES INTERFERONS DE TYPE I

L'étude des événements moléculaires reliant l'infection virale et la production d'interférons de type I est en pleine expansion. La conséquence en est la découverte de nouveaux intervenants et la succession de modèles théoriques. A l'heure actuelle deux voies principales sont retenues : une voie de signalisation dite classique et une voie qui passe par les récepteurs "Toll-like" de découverte récente.

VOIE CLASSIQUE

Le facteur IRF-7 y joue un rôle central pour l'induction des IFNs. Le mécanisme d'activation passe par la formation d'un complexe de type kinase. "RIG-1" (pour *Retinoïc acid Inductible Gene*)⁶², le premier intervenant est une protéine contenant un domaine hélicase, capable de reconnaître le dsRNA, signature de la réplication de nombreux virus. L'interaction de RIG-1 avec l'ARN viral a pour conséquence un changement de conformation qui induit la formation de liaisons entre

le domaine CARD (*Caspase Recruitment Domain*) de RIG-1, de RIP1 ou "Receptor Interacting Protein" et de FADD "Fas-Associated protein with Death Domain".⁶³ Le complexe ainsi formé active TBK1, une kinase capable à son tour d'activer IRF-7.^{64, 65} Celui-ci, sous la forme homodimérique IRF-7/IRF-7 ou hétérodimérique IRF-7/IRF-3, subit une translocation nucléaire et induit, par sa liaison avec les différents PRDs, la sécrétion des interférons α/β .

Par un mécanisme de rétroaction positive induite, ceux-ci activent la synthèse *de novo* d'IRF-7 et de RIG-1 en utilisant la voie classique de signalisation des interférons de type I (Fig.11). Cette rétroaction explique le caractère biphasique de la réponse à l'infection virale.^{66,67} La première phase requiert la présence d'un niveau basal d'IRF-3 phosphorylé ; la seconde, déclenchée par une stimulation autocrine et paracrine des cellules, est confiée à IRF-7 qui va induire la production massive des interférons α et β .

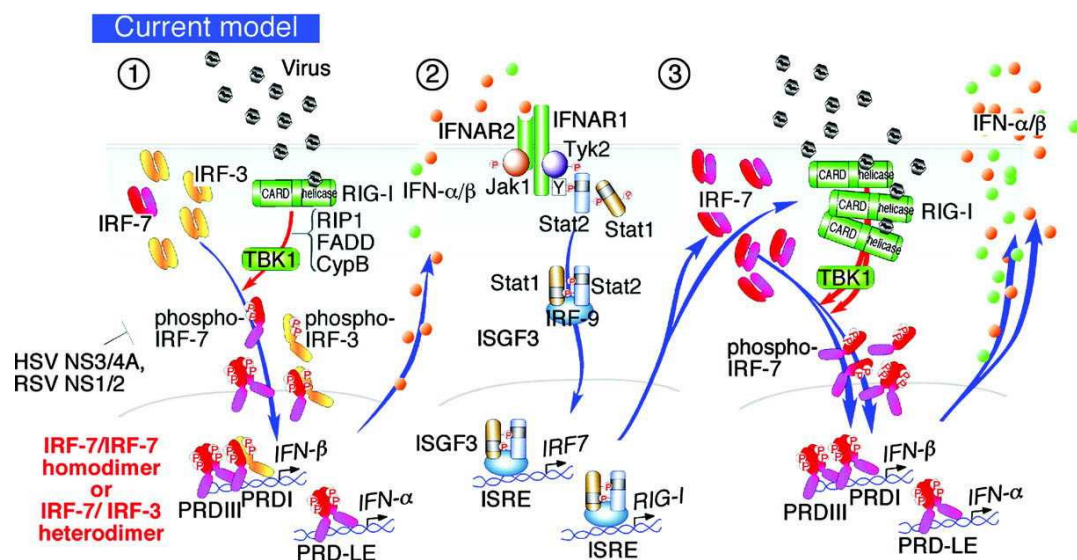


Fig.11 : Voie classique d'induction des interférons de type I par l'infection virale. L'ARN viral interagit avec RIG-1 ce qui a pour effet d'activer TBK1, une kinase spécifique de IRF-7, via le recrutement essentiellement de RIP-1 et de FADD. La phosphorylation des IRF-7 peut-être inhibée par certaines protéines virales (NS1/NS2 du virus syncytial respiratoire par exemple). IRF-7, seul ou associé à IRF-3, active la transcription des gènes INFs. Les interférons produits activent, à leur tour, la production de IRF-7.

VOIE "TOLL-LIKE"

De découverte récente, les récepteurs "Toll-like" ou "TLR" sont présents au niveau de la membrane cytoplasmique (TLR4) ou endosomiale (TLR3, 7, 8, 9).^{68, 69} La famille compte au moins 13 membres qui reconnaissent différentes molécules associées à diverses classes de pathogènes (bactéries, virus, champignons...). Un domaine TIR ou "TOLL/Interleukin Receptor" est commun à tous les TLRs : il transmet le signal de fixation en aval par le recrutement de molécules adaptatrices.

Détaillons brièvement les adaptateurs spécifiques des différents TLRs impliqués dans l'activation des interférons de type I en réponse à l'infection virale.

"Toll-like 3"

Ce récepteur est activé par l'ARN bicaténaire viral que celui-ci soit produit lors de la multiplication du virus ou qu'il soit de nature génomique ou de nature synthétique tel que le poly I:C, un analogue chimique de l'ARN bicaténaire.^{70, 71} L'adaptateur sélectionné par le domaine TIR de TLR3, est dans ce cas de figure, TRIF (*TIR* -domain containing adaptator -inducing *IFN*) qui recrute, entre autres facteurs, TBK-1 lequel est responsable de la phosphorylation de IRF-7 et de IRF-3 et, par conséquent, de l'activation de la transcription des IFNs. Cette voie est indépendante du facteur IRAK (*Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase*)⁷² (Fig.12).

"Toll-like 4"

TLR4 est activé par certains constituants de l'enveloppe virale tels que la protéine fusion du virus respiratoire syncytial (« *Respiratory Syncytial Virus* » ou « *RSV* ») ou les protéines membranaires du MMLV ("*Moloney Murine Leukemia Virus*")^{73, 74}. Cette stimulation par les protéines virales est relativement secondaire si on la compare à celle obtenue avec les LPS ou le lipide A, composants des membranes bactériennes Gram- négative^{75,76}. Les adaptateurs moléculaires recrutés ici sont TRAM (« *Toll Receptor Associated Molecule* ») et TRIF⁷⁷ ; la voie TBK-1 semble privilégiée et aboutit à la phosphorylation de IRF-3^{78, 79}. Parallèlement, le recrutement de TRAF6 (*Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor 6*) active la voie NF-κB. Le recrutement d'autres adaptateurs, les facteurs IRAK1-4, TIRAP, TRAF6 et MyD88

(Myeloid Differentiation response gene 88), suite à la fixation à TLR4 de protéines virales, conduit à l'activation de NF- κ B et la production d'IFN- β (Fig.13).⁸⁰

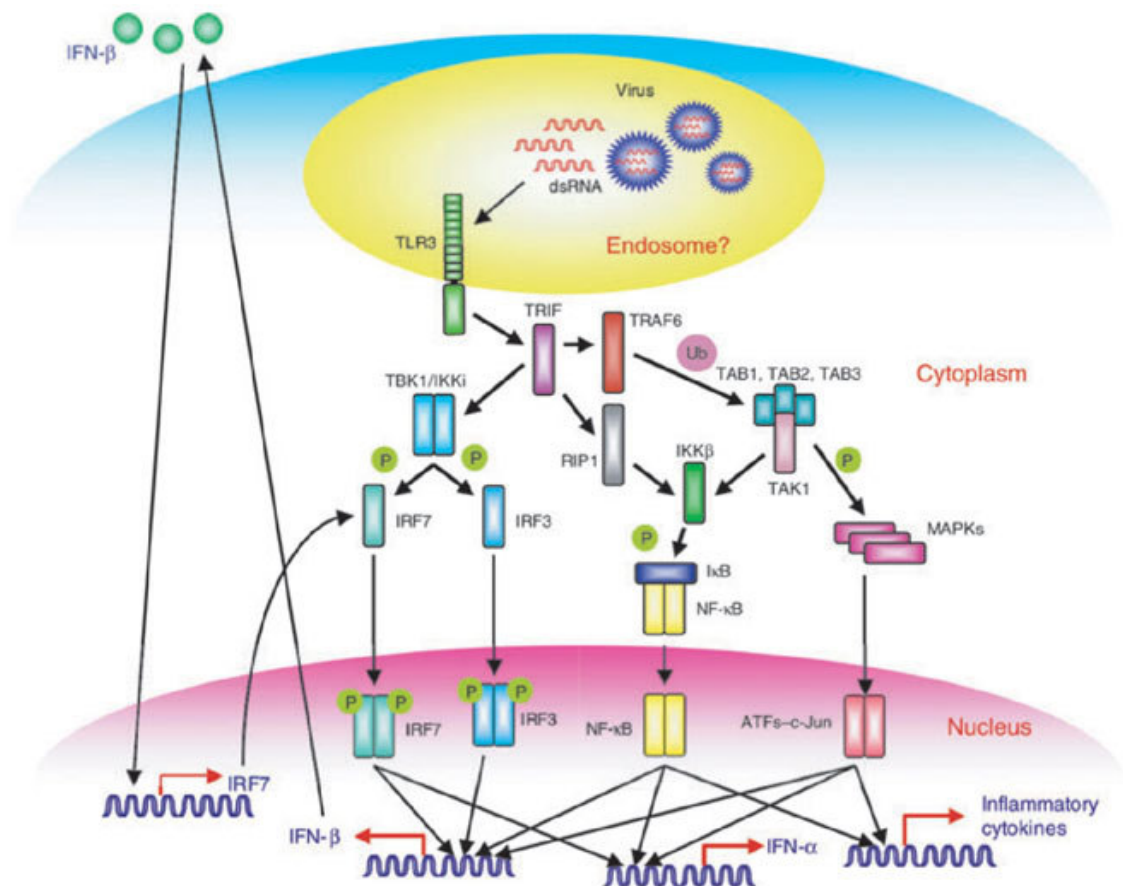


Fig. 12 : Induction de TLR3 par l'ARN viral bicaténaire.

Le signal de reconnaissance de la liaison de l'ARN viral à TLR3 est transmis via TRIF qui interagit avec TBK1/IKKI activant la phosphorylation de IRF-3 et IRF-7 lesquels, après translocation nucléaire, activent les promoteurs de type interféron, en particulier celui de l'INF- β . La sécrétion de cet interféron stimule la production d'IRF-7 qui après phosphorylation induit la production d'INF- α . TLR3 interagit également avec RIP1 et TRAF6 qui sont impliqués dans l'activation de NF- κ B et de ATF2-c-Jun, deux activateurs de la transcription des IFNs.

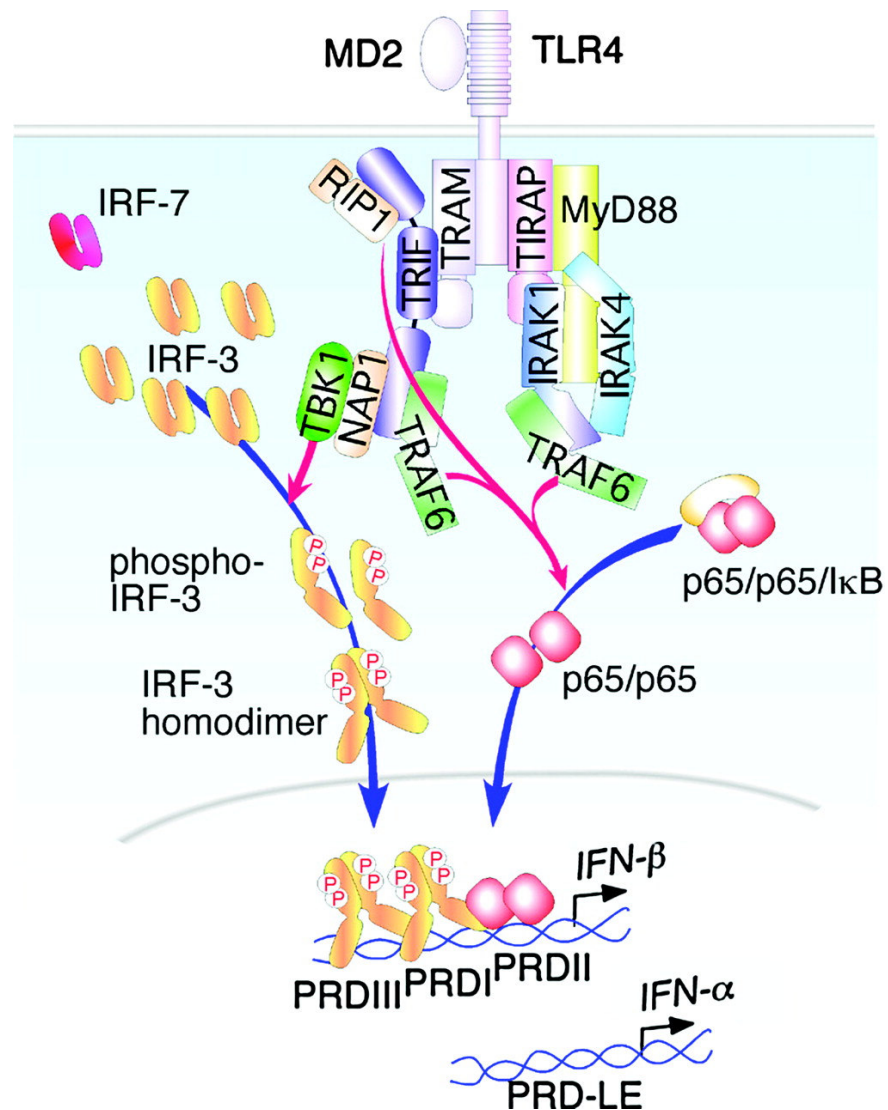


Fig. 13 : Régulation de l'expression des interférons de type I par TLR4. Quatre adaptateurs au moins sont impliqués dans le transfert du signal : TIRAP, MYD88, TRAM et TRIF. Associés à différents ligands protéiques, ils contribuent à générer une réponse modulée. Tandis que TRAM et TRIF activent IRF-3 et NF-κB, la voie MyD88 via le complexe IRAK1/4-TRAF6 active uniquement NF-κB. La translocation nucléaire des molécules phosphorylées IRF-3 et NF-κB et leur liaison au site spécifique PRD du promoteur IFN, activent la transcription d'IFN-β.

L'induction des interférons, dans le cadre d'une infection virale, par les récepteurs TLR3 et TLR4 se révèle différente en fonction de la nature des molécules activatrices (acides nucléiques ou protéines de l'agent pathogène) mais aussi par celle des cytokines exprimées. En effet, l'activation de TLR3 a pour résultat la production des IFNs α et β tandis que celle de TLR4 n'induit que celle de l'IFN β .⁸¹

"Toll-like 7/8 et 9"

Cette sous-famille de récepteurs est responsable de l'activation des IFNs α/β par certains virus⁸². Ainsi, les îlots CpG non méthylés de l'ADN de HSV sont reconnus par TLR9 au niveau de certaines cellules dendritiques (pDCs ou *Plasmacytoid Dendritic Cells*) ; l'ARN génomique simple brin de certains *Orthomyxovirus* active TLR7/8.^{83,84,85} L'adaptateur privilégié de cette famille de « Toll-like receptor » serait le MyD88. La cible est constituée par l'IRF-7, NF- κ B, IRF5... selon le type cellulaire ou la nature des ligands, la spécialisation de la réponse étant modulée au niveau du complexe formé autour de MyD88 (Fig.14).⁸⁶

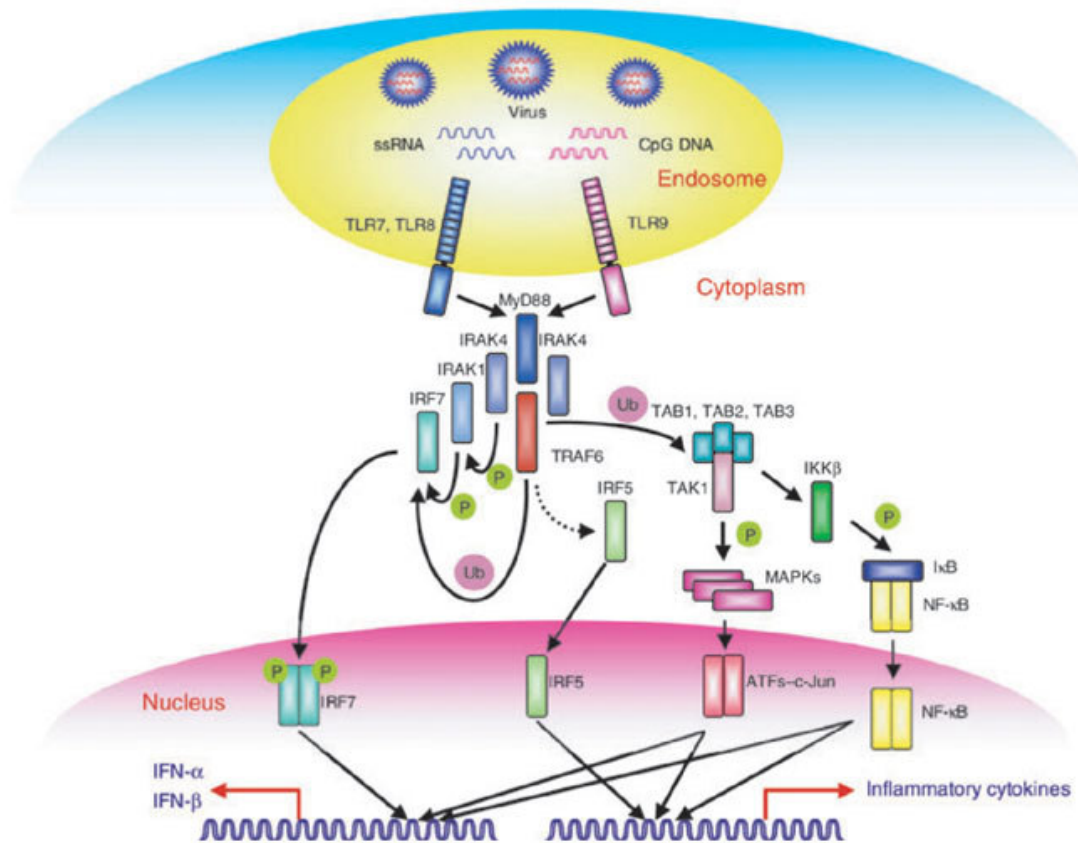


Figure 14. Induction de la production d'IFN α , β par la sous-famille TLR7, TLR8 et TLR9 au niveau des cellules dendritiques. La fixation des acides nucléiques viraux par TLR7, TLR8 et TLR9 conduit au recrutement de l'adaptateur MyD88, qui interagit avec IRAK4 et IRAK1 et TRAF6⁸⁷. Par l'intermédiaire d'IRAK1 et d'IRAK4, IRF-7 est phosphorylé et après sa translocation nucléaire, régule la transcription des interférons de type I. TRAF6, quant à lui, via son interaction avec un complexe dépendant du mécanisme d'ubiquitinylation utilise les voies classiques NF- κ B et ATF2-c-Jun pour activer les cytokines de l'inflammation et accessoirement les IFNs α et β .

I.1.5. LES PROTEINES CELLULAIRES DE LA RESISTANCE INNEE

Les interférons α/β exprimés en réponse à une infection virale induisent une réponse qui se traduit par l'activation de la transcription de gènes qui codent pour un nombre important de protéines antivirales. Les analyses des profils d'expression indiquent que le nombre des molécules activées est élevé, dépend du type cellulaire et évolue dans le temps. Le nombre de gènes répondant à une régulation positive par les interférons est supérieur à 700.^{88,89} De façon attendue, les interférons exercent aussi une régulation négative sur d'autres gènes.

Parmi les protéines induites par les interférons de type I, les plus importantes par leur activité virale sont PKR (*Protein kinase RNA* dépendante), OAS (2',5'-*Oligoadenylate synthetase*) et la RNase L, l'ISG20 et les protéines MX. On peut y ajouter ADAR1 (*Adenosine deaminase RNA*), une déaminase spécifique de l'ARN possédant une fonction éditrice.⁹⁰ Ces types d'effecteurs affectent la réplication virale au sein de la cellule par des mécanismes connus ou non encore découverts.

EFFECTEURS ANTIVIRAUX CELLULAIRES A MECANISME CONNU

Dans ce groupe, non exhaustif, nous avons rassemblé les molécules canoniques de l'activité antivirale innée dont le mode d'action est largement décrit et démontré sans ambiguïté. Tantôt celui-ci est évident et est directement lié à une activité enzymatique (ISG20), tantôt il participe à une séquence coordonnée qui intègre plusieurs éléments dont les rôles particuliers sont clairement identifiés (PKR ; OAS).

La protéine kinase PKR

La protéine kinase - 62kDa pour la version humaine - possède une activité dépendante de l'ARN ; elle se rencontre essentiellement dans le cytoplasme des cellules traitées à l'interféron en association avec les ribosomes. L'activation de la PKR par l'ARN double brin via une auto-phosphorylation aboutit à la formation d'un dimère qui va agir sur au moins deux substrats cellulaires : PKR elle-même⁹¹ et le facteur d'élongation eIF-2 α . La phosphorylation de ce dernier inhibe la traduction en

empêchant la réaction d'échange du nucléotide guanine catalysée par le facteur d'élongation eIF-2B.⁹² Les propriétés antivirales de PKR ont été établies pour le reovirus⁹³, le West Nile virus⁹⁴, le virus de la stomatite vésiculeuse⁹⁵, l'herpes simplex virus⁹⁶, le virus de la fièvre aphteuse⁹⁷, de l'hépatite C⁹⁸...

La 2',5'-Oligoadenylate synthetase ou OAS

Induites par l'interféron, activées par de l'ARN bicaténaire, les 2',5'-oligoadénylate synthétases sont les seules enzymes capables de catalyser le transfert d'un nucléotide en position 2' dans une réaction de type polymérase. Elles constituent une famille d'enzymes mise en évidence chez de nombreuses espèces de mammifères mais aussi d'oiseaux et de reptiles. Le nombre de gènes distincts identifiés chez l'homme est de trois. Les isoenzymes rencontrées - p40/46, p69/71 et p100 - indiquent qu'un mécanisme d'épissage est généré lors de la transcription des deux premiers gènes.⁹⁹ Leur produit, les 2'-5'-oligoadénylates, sont les activateurs de la RNase L (ou latente) qui forme, selon l'isoenzyme, un monomère, un dimère¹⁰⁰ ou un tétramère. L'hydrolase a pour cible principale les ARN cellulaires et viraux. Elle serait capable de détruire ceux-ci spécifiquement.¹⁰¹

ISG20

Exonucléase de la famille 3'→5', cette protéine est induite par l'interféron ou l'ARN bicaténaire. D'une masse moléculaire de 20 kDa, l'ISG20 possède une affinité pour les ARN monocaténaires.^{102,103} Son action antivirale contre trois virus à ARN génomique, le VSV, l'influenza virus et le virus de l'encéphalomyocardite a été démontrée alors que, parallèlement, elle s'est révélée inactive contre un virus à ADN génomique, l'adénovirus.¹⁰⁴ Sa cytolocalisation est cytoplasmique et nucléaire. En particulier, elle est associée aux sous-structures du noyau, le nucléole et les corps de Cajal ou "Cajal bodies" qui sont caractérisés par la présence de facteurs de transcription et d'épissage.^{105,106}

L'ADAR-1 ou "adenosine deaminase acting on RNA"

Cette enzyme est capable d'éditer l'ARN en transformant l'adénosine en inosine par déamination. L'inosine des transcrits ARN est traduit comme s'il s'agissait d'une guanosine. Chez les mammifères, la famille comprend trois membres, ADAR1,

ADAR2 et ADAR3. La fonction éditrice est confirmée pour les deux premiers, elle ne l'est pas pour le troisième.¹⁰⁷ La cible d'ADAR1 et ADAR 2 est l'ARNm mais aussi les longs duplexes d'ARN.¹⁰⁸ La plupart des tissus sont capables de produire les deux enzymes. D'un point de vue cytogénétique, ADAR1 est essentiellement présent au niveau du cytoplasme tandis que ADAR2 est confiné au niveau du noyau. Une forme tronquée mais active d'ADAR1 est circonscrite au niveau du noyau. Les transcrits viraux sont édités à une densité élevée. Ainsi en est-il des transcrits de l'hépatite D et du polyoma virus, un virus à ADN.¹⁰⁹

La forme cytoplasmique et complète d'ADAR1, une protéine de 150 kDa encodée par un gène sous le contrôle d'un promoteur interféron dépendant semble être plus particulièrement impliquée dans l'édition virale. Enfin, une endonucléase spécifique des RNA hyper-édités i.e. comprenant des zones riches en inosine a été identifiée comme co-effecteur du mécanisme de résistance innée s'appuyant sur le principe d'édition d'acides ribonucléiques.¹¹⁰

EFFECTEURS ANTIVIRAUX CELLULAIRES A MECANISME INCONNU

Dans l'état actuel des connaissances, nous ne pouvons certifier que le recensement des effecteurs antiviraux cellulaires soit complet. Par contre, il existe un ensemble de protéines, décrites ci-après, dont la capacité antivirale est largement démontrée mais dont le(s) mode(s) d'action conserve(nt) une large part de mystère.

Les protéines MX

Les protéines MX appartiennent à la superfamille des dynamines. Elles ont été identifiées chez de nombreuses espèces animales appartenant à différentes classes de vertébrés : on les retrouve chez les mammifères, les oiseaux, les poissons.^{111,112,113} Chez la plupart des espèces étudiées, deux ou trois isoprotéines codées par des gènes distincts, ont été identifiées.^{114,115,116,117} Leur structure a été décrite dans la partie « généralités » du présent volume (cfr.supra). Par rapport aux protéines antivirales décrites ci-dessus, elles présentent la caractéristique de procéder par un mécanisme encore largement inconnu. Par leur capacité à s'assembler en solution pour former des oligomères pouvant compter plus de 30 éléments, elles ont suggéré à certains auteurs l'idée d'un mécanisme hypothétique impliquant la séquestration de la nucléocapside ou d'autres protéines virales.^{118,119,120} Parfois, les homopolymères de MX sont décrits

comme une réserve de molécules inactives dont la dépolymérisation est nécessaire à la fonction inhibitrice de la réplication virale.¹²¹ L'étude de la version bovine de MX1 constituant l'essence même de notre travail, nous nous attacherons dans les pages suivantes à détailler l'état actuel des connaissances sur le "système MX".

I.2 LE SYSTÈME MX

I.2.1. GENERALITES

ASPECTS HISTORIQUES

L'acronyme "Mx" a été créé en 1962 par Lindenmann qui venait de découvrir que la souche de souris consanguine A2G était capable de résister à une infection par un Influenza virus A (*Orthomyxoviridae*) adapté à la souris (*Mus musculus*).^{122,123} Le phénotype désignant la résistance au myxovirus fut appelé Mx+. L'étude génétique montra que ce trait était transmis de façon simple, autosomale et dominante.¹²⁴ Un nombre limité de souches consanguines le partage (A2G, CastEi, SI/Nia) alors qu'il est présent chez une majorité de souris sauvages.¹²⁵ De façon remarquable, ce trait de résistance n'était pas aboli par les immunosuppresseurs (cyclophosphamide) ou par l'irradiation. De plus, le phénotype peut être introduit chez des souris athymiques. L'ensemble de ces données indiquait que la résistance observée était bien indépendante du système immunitaire classique, adaptatif.^{126,127} L'implication de l'interféron de type I dans ce type de réponse dite innée fut établie plus tard par la démonstration de la suppression du phénotype résistant par injection d'un antisérum aux souris A2G.^{128,129} La stimulation de macrophages issus de souris A2G par l'interféron et la résistance acquise confirma cette implication ; elle permit également par analyse électrophorétique en 2D d'identifier une protéine de 78 kDa absente chez les cellules stimulées de souris sensibles, la protéine MX.¹³⁰

REGULATION DE L'EXPRESSION DE MX

La protéine MX n'est normalement pas détectée, son taux d'expression constitutive étant pratiquement nul. Par contre, en cas d'infection virale, les cellules

produisent des quantités importantes de MX, celles-ci pouvant représenter 0.5 à 1% du contenu protéique cellulaire.¹³¹ La régulation des gènes *Mx* est essentiellement sous le contrôle des IFNs α/β .^{132,133} Toutefois, d'autres cytokines peuvent également jouer un rôle : l'interleukine-1 α , l'interleukine-1 β , l'IFN-gamma sont également inducteurs mais cette action nécessite la synthèse préalable de protéines. L'ARN double-brin est un inducteur puissant de l'expression de MX.^{134,135}

Pour des raisons physiologiques évidentes, la mise en place d'une réponse rapide à l'infection virale est primordiale. La cinétique d'apparition de MX au sein des cellules stimulées par les IFNs α/β apparaît compatible avec cette exigence puisqu'elle est détectable au niveau des transcrits au cours des premières 90 minutes après stimulation par les IFNs α/β . Des cellules de souris *Mx+* présentent un pic de synthèse d'ARNm 3 heures après le traitement par l'interféron ; endéans les 5 heures la concentration en ARNm *Mx* est passé d'une concentration indétectable à 0.1% de l'ARNm total.¹³⁶ L'état d'équilibre est atteint 5 à 6 heures après la stimulation initiale. Ensuite, la concentration en transcrits chute et redevient indétectable 36 à 48 heures après l'induction initiale. Parallèlement, au niveau protéique, des expériences réalisées sur cellules humaines montrent que MXA commence à s'accumuler 4 heures après l'ajout de l'inducteur pour atteindre son plateau après 24 heures. Celui-ci se maintient pendant 24 heures encore avant de s'infléchir. La demi-vie de la protéine a été estimée à 2.3 jours.¹³⁷ La stimulation par l'Influenza A génère un profil similaire si ce n'est que les transcrits *MxA* semblent maintenir leur concentration stable pendant un temps plus long pouvant atteindre 48 heures ; la protéine MXA suit cette tendance.¹³⁸

ORGANISATION DU PROMOTEUR DU GENE MX

Chez la souris, le promoteur de *Mx1* s'étend sur une région de 140 bases situées en amont du site de capping. Classiquement, il comprend une TATA box et un site Sp1 entre les positions -43 et -20. La spécificité du promoteur est assurée par cinq copies d'une séquence particulière dénommée ISRE (*Interferon-Stimulated Responsive Element*) dont le motif général GAAAN(N/-)GAAA(C/G)-pyrimidine est rencontré chez tous les gènes répondant à la stimulation par les IFNs α/β et ce y compris chez les poissons.^{139,140,141} Globalement, les caractéristiques structurales et fonctionnelles sont retrouvées au niveau du promoteur d'autres espèces.^{142,143,144,145} Les différentes copies ne semblent pas toutes avoir la même efficacité. Ainsi, le promoteur de *MxA*

possède deux ISREs proximaux et un "ISRE-like" distal mais ce dernier n'est pas fonctionnel.¹⁴⁶

ACTIVATION DU PROMOTEUR DU GENE MX

Cette activation, nous l'avons rapporté, est sous la dépendance des interférons de type 1. Le mécanisme de transduction du signal induit par les IFNs α, β est très bien décrit.¹⁴⁷ La fixation sur le récepteur constitué par les sous-unités distinctes IFNAR1 et IFNAR2 entraîne leur dimérisation. Les deux kinases qui leur sont respectivement associées Tyk2 et Jak1 sont activées par phosphorylation.^{148,149} A leur tour, les facteurs STAT (*Signal de Traduction et Activateur de Transcription*) 1 et 2 sont activés, forment un hétérodimère et s'associent au facteur ISGF3 γ (*Interferon Stimulated Gene Factor*) encore appelé IRF-9.¹⁵⁰ Le complexe subit une translocation nucléaire et après fixation au niveau des séquences ISREs en amont du gène Mx ou d'autres ISGs (*Interferon-Stimulated Genes*) induit la transcription (Fig.14).

La stimulation par les IFNs α ou β ne semble pas équivalente. Ainsi, dans certaines circonstances, l'activation de Jak1 ne serait détectable que lors du traitement de cellules par l'IFN β et serait à l'origine de la concentration plus importante en ISFG3 obtenue par l'utilisation de cet IFN.¹⁵¹

CYTOLOCALISATION DES PROTEINES MX

Les protéines MX1 murine et MX1 du rat sont détectées au niveau nucléaire^{152,153} ; les autres protéines MX répertoriées présentent une localisation cytoplasmique.¹⁵⁴ La MXB humaine ou huMXB se singularise par sa répartition cytoplasmique et nucléaire.^{155,156}

Au niveau cytoplasmique, les protéines MX semblent se répartir dans l'ensemble du volume disponible. En immunofluorescence, l'aspect est punctiforme. L'interaction avec certaines protéines cellulaires et/ou membranes lipidiques associée à la formation d'oligomères pourrait être la cause de cette apparence.^{157,158} Au niveau nucléaire, la Mx1 de souris semble former des domaines associés à des structures nucléaires (NBs ou "nuclear bodies") mais indépendantes d'un point de vue fonctionnel.¹⁵⁹

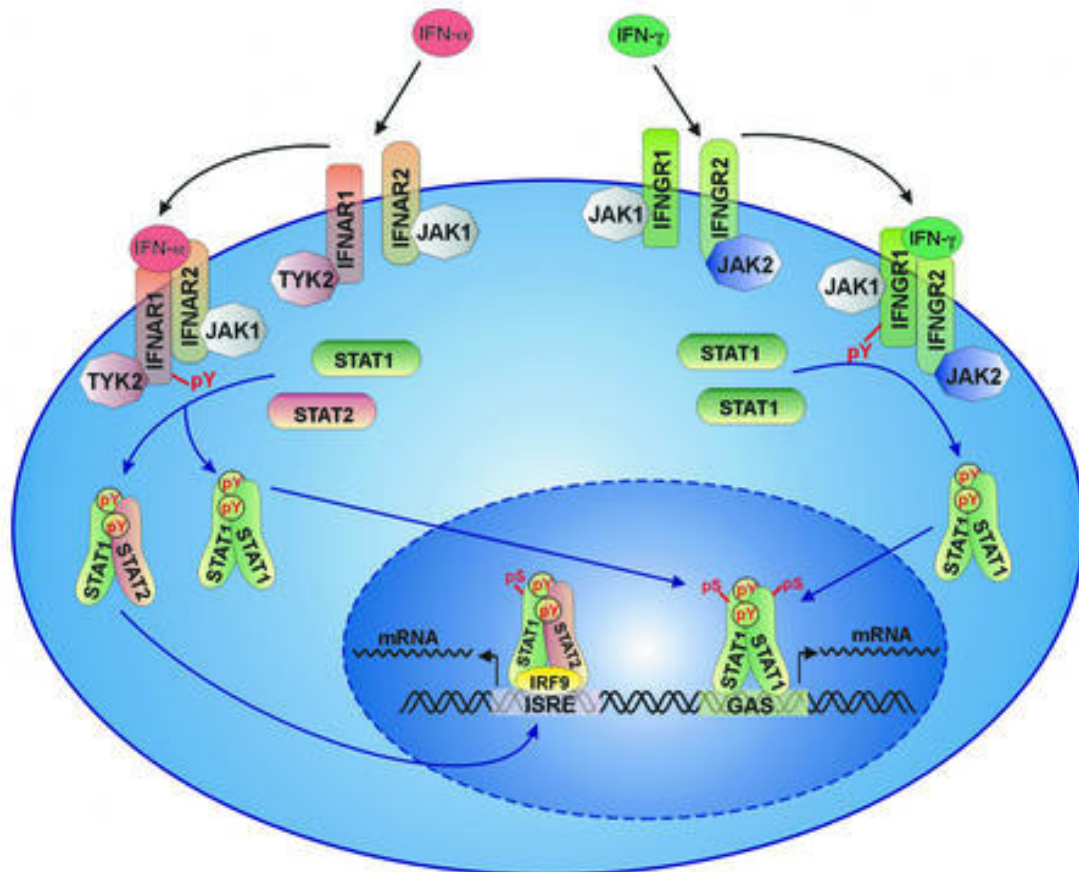


Fig.15. Schéma comparatif des voies de transduction du signal pour les interférons de type I et II.

A gauche, IFN α ou β en s'associant à son récepteur induit un réarrangement moléculaire des deux sous-unités IFNAR1 et IFNAR2 du récepteur. Les kinases associées Jak1 et Tyk2 (Janus kinase et Tyrosine kinase) sont activées par phosphorylation et, à leur tour, induisent la formation de l'hétérodimère Stat1-Stat2 cytoplasmique lequel s'associe au facteur IRF-9 (ou ISGF3 γ) pour former un complexe ISGF3 (Stat1-Stat2-IRF9) qui, après translocation nucléaire, se fixe au motif ISRE et active la transcription des gènes ISGs dont Mx fait partie.

A droite, IFN γ trouve un récepteur spécifique qui lui aussi subit un réarrangement de ses sous-unités IFNGR1 et IFNGR2 suite à la fixation de la cytokine. Le schéma général est identique à celui décrit pour les IFNs α/β . Cependant, on remarque que Tyk2 est remplacé par Jak2. L'activation est réalisée via un homodimère Stat1-Stat1 lequel s'associe au niveau nucléaire à une séquence spécifique GAS ou (Interferon) Gamma Activated Site.

STRUCTURE DES PROTEINES MX

Les protéines MX appartiennent à la superfamille des dynamines. Elles sont classées dans un sous-groupe appelé "Dynamine-like". Leur structure générale est celle des dynamines. Comme décrit dans le paragraphe consacré à la structure générale des dynamines, elles possèdent les caractéristiques minimales requises pour appartenir à cette famille : une partie NH₂-terminale constituée par un domaine globulaire GTPase (> 300 acides aminés) présentant une structure spécifique, un domaine intermédiaire, dynamine-M, et le GED ou groupement effecteur (Fig.16). Les deux derniers sont impliqués dans la formation de structure quaternaire d'ordre supérieur (oligomères) et la régulation de l'activité GTPasique. Détaillons ces domaines.

a. "Dynamine-N" ou domaine GTPase

Le domaine comporte un motif de fixation du GTP, conservé chez toutes les MX connues et composé de trois séquences discontinues caractéristiques dont le "pattern" général est GxxxxGKS, DxxG et T/NKxD. Chez la souris, ces trois éléments occupent les positions 43-50, 144-147 et 213-216 respectivement de la séquence protéique de Mx1.¹⁶⁰ La contrainte sur la nature du substrat est très élevée puisque la fixation d'ATP, de CTP ou d'UTP et, par conséquent leur hydrolyse, est clairement impossible.¹⁶¹

Une partie remarquable de cette partie NH₂-terminale est constituée par la présence d'une zone d'interaction intermoléculaire dite d'auto-assemblage. Mise en évidence chez la souris, elle s'étend de la position 51 à 99, entre les deux premiers éléments du motif de fixation du GTP. La polymérisation de la protéine semble indépendante de la présence de GTP et est intrinsèquement liée à la séquence d'auto-assemblage ; par contre, la structure du polymère est sous le contrôle du GTP.¹⁶²

b. "Dynamine-M" ou région intermédiaire

Chez la MX1 murine, elle correspond aux acides aminés compris entre les positions 226 à 521 c'est-à-dire juste en amont du GED (538-629). Elle est présente chez toutes les MX et chez les dynamines. Cette structure est peu caractérisée.

c. GED ou domaine effecteur

En l'absence du domaine PH ou "Pleckstrin Homology domain" défini chez les dynamines, le GED suit directement la région intermédiaire de MX et en constitue l'extrémité C-terminale. Au sein de la superfamille des dynamines, il est reconnu pour être responsable de l'oligomérisation de la protéine. Des études par RMN ont montré que ce domaine présente une structure essentiellement hélicoïdale conservée au sein de la molécule sous sa forme polymérique.¹⁶³ L'implication du GED de MX dans une fonction identique est également proposée.¹⁶⁴ Un motif particulier appelé "leucine zipper" consistant en une répétition périodique du résidu leucine a été identifié. Il correspond à la séquence L-x(6)-L-x(6)-L-x(6)-L (Fig.17 et 18). D'un point de vue structural, le motif adopte une conformation de type hélice α comprenant au minimum 8 tours d'hélices (30 résidus d'acides aminés). L'interaction d'un leucine zipper avec son *alter ego* appartenant à un autre polypeptide facilite la formation de dimère.^{165,166}

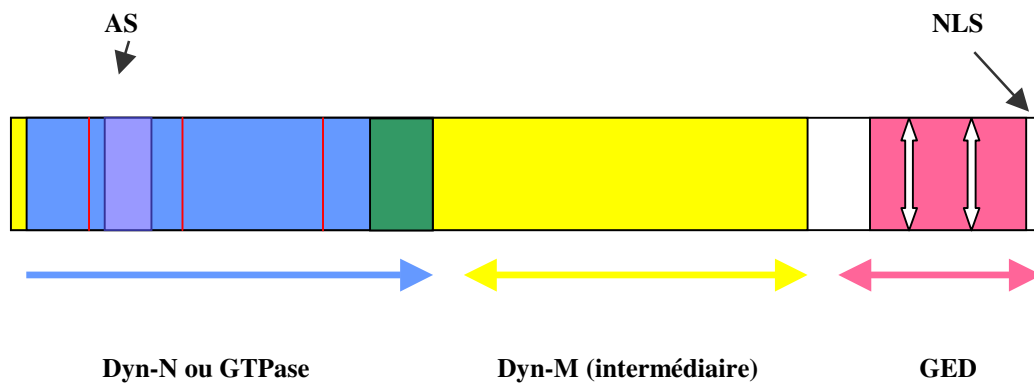


Fig.16. Vue schématique des domaines et motifs de la protéine MX. La partie NH2 terminale de la protéine MX est dédiée au domaine GTPase spécifique de la superfamille des dynamines. Il comprend trois sites de fixation du GTP (position 43-50, 144-147 et 213-216 chez la MX1 murine) en rouge et un site potentiel d'auto-assemblage (AS). Le domaine intermédiaire, très conservé, est peu caractérisé d'un point de vue structure. Il s'étend des acides aminés 226 à 521 (MX1 murine) et chevauche (en vert) partiellement le domaine Dyn-N. En l'absence du domaine PH présent chez les dynamines, le domaine effecteur (GED), nonobstant une courte séquence peu définie (en blanc), lui succède directement, du côté C-terminal (position 538-629 dans notre exemple murin). Il comprend deux motifs "leucine zipper" (flèches blanches verticales). Enfin, dans le cas particulier des protéines MX à localisation nucléaire, un signal de localisation NLS (Nuclear Localisation Signal) occupe les dernières positions de la séquence.

		*	20	*	40	*	
Bos	:	----	STDEIFQHLTAYQQEVSTRISGHIPLIIQFFV	RTYGEQ	KKSM	LQ	: 46
Homo	:	--DSSME	EIQHLMAYHQEASKRIS	SHIPLIIQFFM	QTYGQQ	LQKAM	LQ : 48
Mus	:	QKGLTT	TEMTQHLKAYYQECRRNIGRQIPLIIQYFI	IKTFGE	EEKM	MMLQ	: 50
Ovis	:	-----	TAEIQHLMAYHQEVSTRIS	SHIPLIIQFFV	RTYGEQ	KKSM	LQ : 45
Sus	:	-----	EIQHLLIAYHQEVGKRIS	SHIPLIIQFFI	IRTFGQQ	LQKSM	LQ : 43
Gallus	:	QCPSFA	LEMVSHVKAYFTGASKRLSNQIPLIILSTV	HD	FGNY	LQTSML	LH : 50
		E6	qH6	AY	qe	r6s	IPLIIq f6L t5G 6 k MLq
		60	*	80	*		
Bos	:	LLQDKDQYDWLLKERTDTRDKRKF	KKERLER	TRARQR	LAKFP	-G	: 90
Homo	:	LLQDKDTYSWLLKERSDTSDKRKF	KKERLAR	TQAR	-----		: 84
Mus	:	LLQDTSKCSWFLEEQSDTREKKKF	KKRLLR	DEARQK	LAKF	--S	: 93
Ovis	:	LLQDKDQYDWLLKERTDTRDKRKF	KKERLER	SRARQR	LAKFP	-G	: 89
Sus	:	LLQNKDQYDWLLRERSDTSDKRKF	KKERLMR	TQARQV	PR	----L	: 84
Gallus	:	LLQGEINYLQEDHEAANQQKL	TSRIS	HNKAYQY	VDFK	SL	: 95
		LLQ	k	5L	E	dt	k kFlk R6 rL Arq

Fig.17. Alignement de l'extrémité C-terminale correspondant au groupement effecteur ou GED de protéines MX1. Les leucines appartenant au motif leucine zipper sont colorées en rouge. Chez la souris, le troisième résidu "L" du premier motif leucine zipper est remplacé par une isoleucine (colorée en jaune). Les protéines MX1 analysées appartiennent aux espèces bovine (BOS), ovine (OVIS), porcine (SUS), humaine (HOMO), murine (MUS) et « galline » (GALLUS).

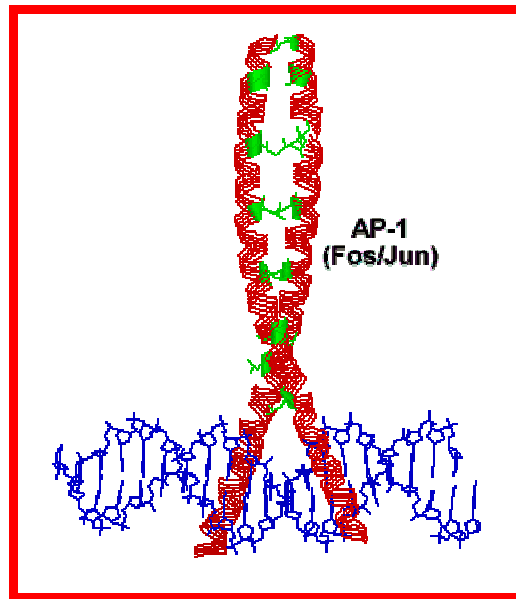


FIG 18. Structure générale du motif leucine zipper. Structure du complexe formé par un acide nucléique (en bleu) en interaction avec le facteur de transcription AP-1(en rouge). Le leucine zipper n'est pas un motif d'interaction avec les acides nucléiques mais, par la formation de dimère ou de polymère d'ordre supérieur, permet la mise en place des structures protéiques actives. Les résidus leucines appartenant aux deux hélices parallèles en interaction sont représentés (en vert).

ACTIVITE GTPASIQUE DE MX

Les protéines sont des GTPases et cette activité enzymatique est nécessaire à leur activité antivirale. Les paramètres cinétiques ont été déterminés pour les versions MX1 murines et MXA humaines (Tableau 1). L'activité dépend strictement de la présence des ions Mg^{++} . Curieusement, Mx1 présente une thermostabilité inférieure à MXA avec un écart de $10^{\circ}C$ sur les courbes de dénaturation (T_{D50}). La spécificité vis à vis du substrat GTP est confirmée tant par l'absence d'activité sur les substrats analogues (ATP, UTP et CTP) que par celle d'une inhibition compétitive en leur présence. Il n'est pas possible actuellement d'établir un lien entre les caractéristiques cinétiques et d'affinité de MX1 et MXA pour le substrat et leurs fonctions antivirales respectives¹⁶⁷.

Tableau 2 - Paramètres cinétiques de MX1 murine et MXA humaine

Paramètres	MX1	MXA
Km	$65 \pm 4.0 \mu M$	$62 \pm 1.5 \mu M$
Vmax	$7.1 \pm 0.24 \text{ mol/min mol}$	$3.1 \pm 0.04 \text{ mol/min mol}$
Kd GDP	$1.0 \pm 0.1 10^{-7} M$	$1.8 \pm 0.5 10^{-7} M$
Kd GTP γ S ¹	$3.4 \pm 0.3 10^{-5} M$	$5.9 \pm 0.5 10^{-6} M$

¹ Analogue de substrat non hydrolysable.

I.2.2. FONCTIONS ANTIVIRALES

DOMAINES CONCERNES PAR L'ACTIVITE ANTIVIRALE

Aucun site spécifique d'activité antivirale n'a été mis en évidence. En réalité, de nombreuses études de mutagenèse dirigée réalisées sur les différents domaines des protéines MX tendent à montrer que l'ensemble de la molécule participe à la fonction¹⁶⁸. L'identification d'une mutation pouvant entraîner une suppression de l'activité vis-à-vis d'une espèce virale sans pour autant diminuer l'efficacité à l'encontre d'une autre a été rapportée.

Domaine Dyn-N ou GTPase

L'implication de ce domaine dans l'effet antiviral des protéines est largement démontrée¹⁶⁹. En particulier, la fixation du GTP apparaît essentielle et toute modification du site de fixation du GTP réduit fortement voire anéanti la fonction antivirale¹⁷⁰. Parallèlement, la délétion de sept acides aminés de la partie COOH terminale (GED) réduit les activités GTPasique et antivirale, et suggère une interaction physique entre les deux domaines¹⁷¹. Cependant, l'activité GTPasique *per se* ne semble pas requise puisqu'un mutant de huMXA (L612K) qui possède un site de fixation du GTP intact mais aucune activité GTPasique détectable, conserve sa capacité inhibitrice sur la réplication des virus VSV et Thogoto¹⁷². Par contre, ce mutant semble incapable de former des structures oligomériques et est rapidement détruit. Le mutant T103A perd à la fois son activité GTPase et ses propriétés antivirales. Co-exprimé avec la forme sauvage huMXA, il exerce un effet dominant négatif qui se manifeste par la susceptibilité des cellules huMXA positives aux virus influenza A, Thogoto et VSV¹⁷³.

Domaine Dyn-M ou central

Le rôle de ce domaine dans la fonction antivirale des protéines MX a été démontré via l'utilisation d'un anticorps monoclonal (2C12) dressé contre le peptide constitué par les acides aminés correspondant à la séquence s'étendant de la position 432 à 471 de huMXA. Dans le cas particulier du virus Thogoto, une interaction entre la nucléocapside et huMXa a été proposée ; l'utilisation de l'anticorps supprime l'activité GTPase et la protection.^{174,175}

Domaine effecteur ou GED

Ce domaine est clairement impliqué dans la formation d'oligomères comme l'ont montré des expériences impliquant un mutant huMXA modifié par un signal de translocation nucléaire et capable de former un hétérodimère avec la protéine sauvage complète ou avec son domaine effecteur seul¹⁷⁶. Sa séquence protéique est la moins conservée au sein du groupe MX en dehors des deux parties "leucine zipper". Une certaine spécificité à l'encontre de telle ou telle autre espèce virale semble y être encodée. Ainsi, le mutant E645R de huMXA conserve son potentiel vis-à-vis du virus Influenza A et du Thogoto virus mais devient inactif face au VSV¹⁷⁷ et au virus de La Crosse.¹⁷⁸ Des mutants naturels de protéines MX confirment le caractère spécifique associé au GED. Chez le rat (*Rattus norvegicus*), par exemple, MX2 est active sur le virus VSV tandis que MX3 ne l'est pas. Le remplacement des résidus 588 (R588C) et 630 (H630K) du domaine effecteur de MX2 par ceux de MX3 lui fait perdre sa fonction antivirale. L'opération inverse confère une certaine activité anti-VSV à MX3¹⁷⁹. Chez la poule (*Gallus gallus*), le polymorphisme de la protéine en fonction de la race est important puisque pas moins de 14 mutants naturels ont été identifiés. Sur base de l'analyse de la résistance de cellules 3T3 transformées par les différentes formes alléliques, une mutation présente au sein du groupement effecteur (S631N) est en parfaite corrélation avec l'activité anti-VSV.^{180,181}

MECANISME D'ACTION DES PROTEINES MX

A l'heure actuelle, aucun mécanisme général n'a été décrit. Quelques auteurs ont mis en évidence, en culture cellulaire, une interaction avec les protéines de certains virus sans pouvoir démontrer si celle-ci était directe ou nécessitait un partenaire cellulaire. Les études relatives aux propriétés antivirales en fonction de la localisation cellulaire de MX de différentes espèces apportent quelques informations en cette matière sans proposer une réponse définitive.

Activité antivirale et localisation cellulaire

La plupart des protéines MX étudiées sont cytoplasmiques. Deux exceptions majeures à cette règle sont constituées par les protéines MX1 de rat (rMX1) et de souris (moMX1)¹⁸². Cette localisation cellulaire différente a visiblement des implications fonctionnelles. En effet, huMXA et moMX1 sont capables d'inhiber le virus influenza A mais seule la première est active contre le VSV, virus dont le cycle répliatif est exclusivement cytoplasmique contrairement au précédent qui possède également une phase nucléaire.^{183,184} La suppression du signal de localisation nucléaire (NLS) de moMX1 par une mutagenèse (mutation R614E) rend cette protéine exclusivement cytoplasmique mais aussi inactive vis-à-vis des deux virus précités. L'opération inverse qui consiste à rendre nucléaire la huMXA par l'adjonction d'un NLS montre qu'elle perd son activité anti-VSV mais conserve son potentiel anti-influenza¹⁸⁵. A priori, ce comportement ne peut s'interpréter que si les cibles virales ou les partenaires cellulaires des deux protéines de résistance à l'infection virale sont différents¹⁸⁶. L'existence de partenaires cellulaires est rendue plausible par certaines observations. La rMX1 nucléaire est inhibitrice de la réplication du VSV. Aucune interaction directe n'est, dans ce cas, théoriquement possible et, par conséquent, l'expérience accrédite la thèse du "complice" cellulaire. D'autre part, l'inhibition de certains virus est dépendante du type cellulaire. La réplication du virus Semliki Forest est fortement atténuée par huMXA exprimée en cellules HEP-2 (cellules épithéliales humaines) ; en cellules 3T3 (fibroblastes murins), ce potentiel inhibiteur est absent.¹⁸⁷ Le virus de la rougeole n'est pas inhibé chez ces mêmes 3T3 par huMXA mais l'est dans le contexte cellulaire de cellules U937 (cellules tumorales humaines).¹⁸⁸

Interaction avec les protéines virales

L'interaction directe avec certaines protéines virales est également documentée. Dans le cas spécifique de l'inhibition du virus Thogoto par la huMXA, les nucléocapsides entrantes sont "captées" dans le cytoplasme, bloquant la composante nucléaire de la réplication du virus.¹⁸⁹ *In vitro*, la protéine NP (Nucléoprotéine) en présence d'un analogue non hydrolysable du GTP interagit avec huMXA¹⁹⁰. La protéine NP du virus de l'influenza A interagirait également avec huMXA que celle-ci soit cytoplasmique ou rendue nucléaire par mutagenèse¹⁹¹. Toutefois, le blocage de la translocation nucléaire du virus n'étant pas démontré, l'hypothèse d'un mécanisme

d'inhibition du transfert des nucléocapsides néoformées vers le cytoplasme a été émise. D'autres exemples d'interaction entre nucléoprotéines virales et protéines MX sont trouvés dans la littérature. Ainsi, en est-il de la nucléocapside du virus "Crimean Congo fever" et de huMXA¹⁹². Citons encore le cas du virus de La Crosse dont les nucléoprotéines voient leur répartition cytoplasmique normale se relocaliser en vastes complexes périnucléaires en association avec huMXA, à proximité immédiate de membranes appartenant au réticulum endoplasmique lisse.¹⁹³ La nucléoprotéine n'est pas la seule cible des protéines MX puisque dans le cadre de l'infection par l'influenza A, moMX1 inhibe la transcription primaire en se fixant sur la polymérase virale et, de façon plus spécifique, à sa sous-unité PB2.¹⁹⁴

Spectre antiviral des protéines MX

Les protéines MX les plus étudiées sont sans aucun doute les versions humaines huMXA et murines moMX1. Cependant, aujourd'hui, la littérature contient des données relatives aux propriétés antivirales de MX de nombreuses espèces appartenant à la classe des mammifères, des oiseaux ou des poissons. Parallèlement, le nombre de familles virales et de leurs représentants sensibles ne cesse d'augmenter. Dans de nombreux cas, les informations relatives à (aux) (l') étape(s) du cycle de réplication affectée(s) par la protéine antivirale sont également disponibles. Sans être exhaustifs, les tableaux ci-après concentrent largement ces données (Tableaux 3 et 4).

Spectre antiviral de huMXa

Dans le tableau consacré à la protéine MX humaine, on remarquera l'absence de huMXB. Bien qu'exprimée en réponse à une stimulation par l'interféron, celle-ci est orpheline de fonction virale.¹⁹⁵ L'inhibition de la réplication des virus de la famille des *Orthomyxoviridae* par huMXA démontrée *in vitro* a été confirmée *in vivo* à l'aide de souris transgéniques. Il en va de même pour la réplication du VSV appartenant à la famille des *Rhabdoviridae*.¹⁹⁶ Les virus de la famille de *Bunyaviridae* apparaissent généralement sensibles à huMXA ainsi que le montrent les études réalisées sur des espèces appartenant aux différents genres de la famille : *Phlebovirus* (Rift Valley Fever), *Nairovirus* (Crimean Congo Fever), *Bunyavirus* (La Crosse) et *Hantavirus* (Tula et Puumala)¹⁹⁷. Chez les *Paramyxoviridae*, la fonction inhibitrice de huMXA semble circonscrite à certaines espèces puisque si elle est bien démontrée pour le virus Parainfluenza de type 3 humain (*Respirovirus*), elle est nulle dans le cas du virus

respiratoire syncytial humain (*Pneumovirus*).^{198,199} Tous ces virus appartiennent à l'ordre des Mononégavirales ou groupe V qui rassemble les virus présentant un génome de type ARN monocaténaire de polarité négative. La sensibilité des dernières espèces reprises dans le tableau indique que l'activité antivirale n'est pas limitée à cette appartenance. Le virus Semliki Forest et le Coxsackievirus B4 y figurent, bien qu'il s'agisse, respectivement, de représentants des familles *Togaviridae* et *Picornaviridae* du groupe IV regroupant des espèces possédant un ARN monocaténaire de polarité positive.^{214,215} Le Coxsackievirus B4 se distingue cependant de toutes les espèces précédentes par sa structure de type virus non enveloppé. Enfin, la présence d'un virus à ADN, le virus de l'hépatite B représentant type de la famille des *Orthohepadnaviridae* sur cette liste finit de démontrer que le type d'organisation génomique d'un virus n'est pas le critère qui le définit en tant que cible de huMXA.²¹³

Les informations relatives à l'étape du cycle viral ne permettent pas de dégager des règles générales. Au sein même de la seule famille des *Orthomyxoviridae*, des mécanismes d'action aussi différents que l'inhibition de la synthèse des protéines, de la translocation des nucléocapsides ou de l'ARN sont proposées. Aucun mécanisme consensuel n'est donc actuellement décrit.

Spectre antiviral des protéines animales

Chez les rongeurs, la protéine MX1 nucléaire inhibe les virus de la famille des *Orthomyxoviridae*. Contrairement à la protéine huMXA, elle est active contre le virus Dhori appartenant au genre *Thogotovirus* (*Orthomyxoviridae*).²⁰⁰ De façon attendue, la MX1 de souris est sans effet sur le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) dont le cycle de réplication est exclusivement cytoplasmique, laissant cette fonction à la MX2 murine. Il est important de souligner ici que, contrairement aux souches sauvages, la plupart des souris de laboratoire possèdent un gène *Mx* modifié. Chez les souches BALB/cJ, la stimulation par l'IFN- α produit un transcrite présentant une délétion importante de 424 nucléotides ; chez CBA/J, le transcrite correspond à celui codant pour la moMX1 sauvage mais une mutation ponctuelle a pour conséquence de modifier un codon lysine (AAA en position 1378) en un codon stop (TAA).²⁰¹ La traduction de ces transcrits génèrent des protéines inactives ; la population sauvage de souris possède une muMX1 complète et active. Parallèlement, la protéine muMX2 qui comporte 656 acides aminés, est présente et active chez la plupart des souches sauvages (*Mus musculus musculus* et *Mus spretus*) ; elle est absente chez Balb/cJ-A2G

et A2G et la plupart des souches de laboratoire, le cadre de lecture étant affecté, chez ces dernières, par une insertion.²⁰²

De façon étonnante, la protéine MX1 nucléaire de rat inhibe la réplication de ce membre de la famille des *Rhabdoviridae*, fonction qu'elle partage avec la MX2 cytoplasmique du rat.²⁰³ Celle-ci est encore active sur les virus La Crosse et Rift Valley Fever (*Bunyaviridae*). Chez la poule (*Gallus gallus*), la MX1 cytoplasmique a été montrée active contre l'Influenza A et le virus de la stomatite vésiculeuse.²²⁶ Cependant, il existe au sein de l'espèce un polymorphisme MX1 important ainsi qu'en attestent les 14 mutations naturelles découvertes et étudiées à ce jour²²⁶. Une seule race semble posséder la combinaison active contre ces virus. Une certaine variation allélique de MX1 a été démontrée chez le porc (*Sus scrofa*).²⁰⁴ En particulier, une délétion de 11 bases au niveau du GED a pour conséquences un changement de cadre de lecture ("frameshift"), une substitution au niveau de 8 acides aminés et une extension de la séquence protéique de 23 acides aminés dans sa partie C-terminale (Fig. 19). Cependant, ces isoprotéines offrent un même degré de protection contre l'infection virale²⁰⁵.

La MX1 du saumon (*Salmo salar*) possède une activité contre deux virus de poissons. Le virus de la pancréatite nécrotique infectieuse (*Birnaviridae*) appartient au groupe des virus dont le génome est constitué par de l'ARN bicaténaire étendant ainsi potentiellement le spectre antiviral à de nouvelles espèces virales ; celui de l'anémie infectieuse du saumon appartient au genre Isavirus (*Orthomyxoviridae*).^{231,232} Enfin, le carrelet (*Paralichthys olivaceus*) possède lui aussi une résistance, conférée par sa MX1, à un virus de poisson, le rhabdovirus Hirame appartenant au genre Novirhabdovirus (*Rhabdoviridae*).²³⁰



Fig.19. Polymorphisme du GED de MX1 chez *Sus scrofa*. Deux lignées cellulaires révèlent un polymorphisme identifié au niveau de l'espèce : PK15 présente une délétion de 11 bases absentes chez LLC-PK1. Le changement de cadre de lecture induit a pour conséquences la modification de 8 acides aminés et une extension de la séquence protéique qui comprend 23 acides aminés supplémentaires. Les leucines du motif leucine zipper sont encadrées en grisé. D'après Asano et al.

Tableau 3. Virus inhibés par la protéine cytoplasmique MXA humaine.

Espèce virale sensible	Famille du virus inhibé	Etape(s) du cycle viral inhibée(s)	Références
Influenza A	<i>Orthomyxoviridae</i>	Réplication génomique synthèse protéique	206, 207
Influenza C	<i>Orthomyxoviridae</i>	Synthèse de l'ARN	208
Thogoto	<i>Orthomyxoviridae</i>	Translocation nucléaire des nucléocapsides	209
La Crosse	<i>Bunyaviridae</i>	Séquestration périnucléaire de la nucléocapside	210, 211
Rift Valley Fever virus	<i>Bunyaviridae</i>	Synthèse de l'ARN	197
Tula et Puumala	<i>Bunyaviridae</i>	Synthèse de l'ARN	212
Crimean Congo Fever	<i>Bunyaviridae</i>	Interaction avec la nucléoprotéine	213
Hantaan	<i>Bunyaviridae</i>	Synthèse de l'ARN	201
Sandfly Fever Sicilian	<i>Bunyaviridae</i>	Synthèse de l'ARN	201
Stomatite vésiculeuse	<i>Rhabdoviridae</i>	Transcription primaire	214
Parainfluenza type 3	<i>Paramyxoviridae</i>	Post-transcription primaire?	215
Rougeole	<i>Paramyxoviridae</i>	Transcription primaire?	216
Hépatite B	<i>Hepadnaviridae</i>	Post-transcription.	217
Semliki Forest	<i>Togaviridae</i>	Transcription	218
Coxsackievirus B4	<i>Picornaviridae</i>	Pré-transcription?	219

Tableau 4. Activité antivirale de différentes MX animales

Espèces (nom véhiculaire)	Appellation MX (localisation)	Espèce virale sensible	Famille du virus inhibé	Réf.
<i>Mus musculus</i> (souris)	MX1 (nucléaire)	Influenza A	<i>Orthomyxoviridae</i>	220
		Dhori	<i>Orthomyxoviridae</i>	200
		Batken	<i>Orthomyxoviridae</i>	221
		Thogoto	<i>Orthomyxoviridae</i>	222
	MX2 (cytoplasmique)	Stomatite vésiculeuse	<i>Rhabdoviridae</i>	223
		Hantaan	<i>Bunyaviridae</i>	224
<i>Rattus norvegicus</i> (rat)	MX1 (nucléaire)	Influenza A	<i>Orthomyxoviridae</i>	218
		Thogoto	<i>Orthomyxoviridae</i>	225
		Stomatite vésiculeuse	<i>Rhabdoviridae</i>	201
	MX2 (cytoplasmique)	Stomatite vésiculeuse	<i>Rhabdoviridae</i>	218
		Rift Valley Fever virus	<i>Bunyaviridae</i>	217
		La Crosse	<i>Bunyaviridae</i>	217
<i>Gallus gallus</i> (volaille)	MX1 (cytoplasmique)	Influenza A	<i>Orthomyxoviridae</i>	226 ²
		Stomatite vésiculeuse	<i>Rhabdoviridae</i>	227 ²
<i>Canis familiaris</i> (chien)	MX2 (cytoplasmique)	Stomatite vésiculeuse	<i>Rhabdoviridae</i>	227
<i>Sus scrofa</i> (porc)	MX1 (cytoplasmique)	Stomatite vésiculeuse	<i>Rhabdoviridae</i>	228
<i>Paralichthys olivaceus</i> (carrelet)	MX (?)	Hirame	<i>Rhabdoviridae</i>	229
<i>Salmo salar</i> (saumon)	MX1 (cytoplasmique)	Nécrose pancréatique	<i>Birnaviridae</i> ³	230
		Anémie infectieuse	<i>Orthomyxoviridae</i> ⁴	231

² Une seule race³ Virus à ARN génomique bicaténaire⁴ Genre Isavirus nouvellement intégré dans la famille des *Orthomyxoviridae*

Spectre antiviral indéterminé

Comme nous venons de le voir, les protéines MX se sont vues confirmer dans leur rôle de conférer une résistance à l'infection virale. Cependant, certaines sont encore dépourvues de fonction de protection bien identifiée. Parmi ces MX orphelines, huMXB est un exemple caractéristique. Exprimée de façon indépendante de la stimulation par les interférons de type I, elle est impliquée dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire (phase G/S) via le contrôle du "trafic" nucléaire.²³² La protéine de rat MX3 qui diffère de la MX2 dans sa partie C-terminale constitue une autre exception.¹⁷⁹ Le cheval (*Equus caballus*) possède une MXA présentant un certain polymorphisme (trois substitutions d'acides aminés identifiés en position 298, 377, et 562) ; il possède aussi une MXB. L'impact de l'expression de ces MX équines sur la production de virions *in vitro* ou *in vivo* n'a pas été démontrée²³³.

Au moment de débiter le présent travail, une situation similaire prévalait pour les MX bovines (*Bos taurus*).

I.3. LES PROTÉINES MX BOVINES

I.3.1. GENERALITES

Les cellules bovines stimulées par l'IFN de type I produisent une protéine qui est reconnue par des anticorps anti-huMXa ; par ailleurs, la même stimulation appliquée à des cellules immortalisées MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney*) inhibe la réplication du virus Influenza A.^{234,235} L'immunofluorescence attribue une localisation cytoplasmique à cette MX1 bovine.

Un ADNc codant pour une protéine MX1 bovine que nous dénommerons boMX1 a été isolé. Il permet de prédire l'expression d'une protéine comportant 648 acides aminés.²³⁶ La comparaison avec les séquences MXA humaine, MX1 porcine et MX1 ovine révèle une identité, respectivement, de 75%, 80% et 93%. Le locus MX1 a été localisé sur le chromosome 1 bovin.²³⁷ L'analyse génomique a permis de révéler un gène de 60 kB comprenant 15 exons.¹⁴³ Le séquençage d'un clone de type "BAC" a permis d'identifier un gène MX2 adjacent dont la présence a été confirmée dans le cadre du séquençage du génome bovin.

I.3.2. ORGANISATION DU GENE ET DU

PROMOTEUR DE BOMX1

Avant de nous intéresser à l'activité de la BoMX1, notre laboratoire s'est attaché à déterminer la structure du gène et de sa région promotrice.¹⁴³ L'analyse du promoteur a permis d'identifier une séquence ISRE typique située en amont du site d'initiation de la transcription (-118 à -107). Un second élément de type ISRE ("ISRE-like") s'étendant de la position -609 à -598, un site NF- κ B (-761), deux sites interleukines-6 (-14 et -518) et Sp1 (-50 et -637) figurent parmi les éléments identifiables du promoteur. Conformément à ce que la littérature prédit pour les gènes induits par l'interféron, la région contient également 12 ensembles GAAA. Ce promoteur ne contient pas les boîtes classiques TATA et CCAAT. Par contre, il contient 5 régions riches en GC parmi les 340 nucléotides précédant le site d'initiation

de la transcription dont la proximale couvre la zone -20 à -50. La présence de ces séquences est rencontrée au niveau des promoteurs de gènes eucaryotes dépourvus de "boîtes" TATA. Elle est souvent liée au facteur de transcription ubiquiste Sp1 comme dans le cas présent. Enfin, le site de liaison au facteur de transcription NF- κ B semble ne pas être fonctionnel, une caractéristique décrite pour ce site au niveau du promoteur du *MxA* humain.

Le gène comporte 14 introns de longueur fort variable : 4798 paires de bases (pb) pour l'intron 3 ; 312 pb pour l'intron 9. La séquence 5' non traduite (UTR 5') s'étend sur 3 exons de 13 (exon1), 77 (exon2) et 7 (exon3) pb. La région codante débute à la position +8 du troisième exon et se termine à la position 231 du quinzième exon. Ce dernier exon (630 pb) code pour les 77 acides aminés de la partie C-terminale de BoMX1 et comprend l'ensemble de l'UTR 3' (Fig. 19).

La comparaison de la structure des gènes MX1 bovin, murin²³⁸ et humain²³⁹ indique un degré de conservation important au niveau des exons 4-13 qui sont les *alter ego* des exons 6-15 humains et 3-12 murins.

I.3.3. ANALYSE DE L'EXPRESSION

Nos travaux préliminaires ont confirmé ou démontré que la protéine BoMX est produite en réponse à la stimulation par les IFNs de type I, le poly I:C et un virus respiratoire infectant la bête bovine, le parainfluenza de type 3 bovin (*Paramyxoviridae*). Par contre, TNF α , Il-6 ou LPS (lipopolysaccharide) n'induisent pas l'expression de BoMX1.

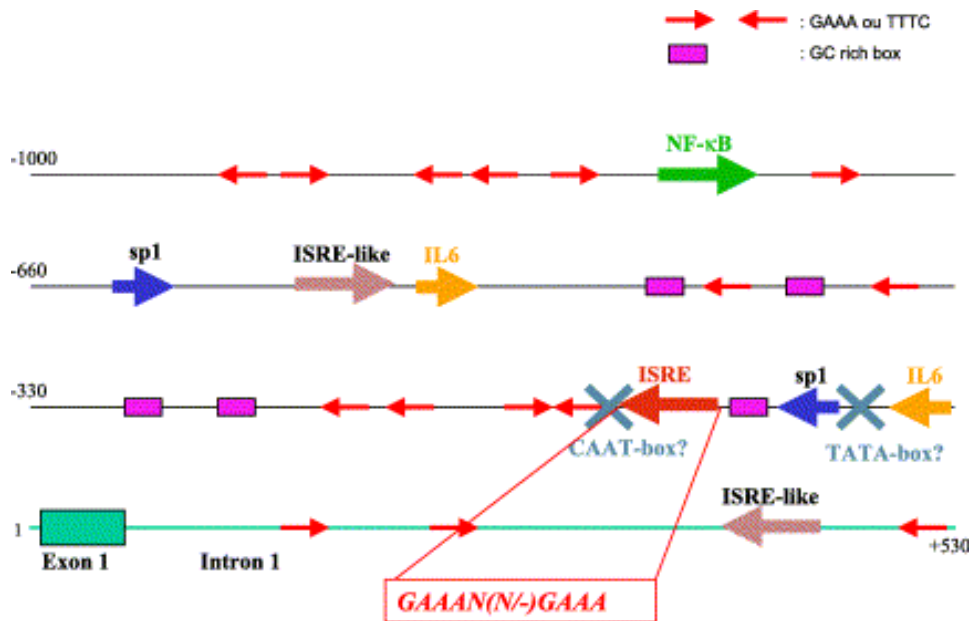


Fig. 19. Organisation du promoteur *Mx1* bovin. La représentation schématique met en évidence les caractéristiques essentielles du promoteur telles que décrites ci-avant. Signalons que la position des différents éléments est indiquée par rapport à une référence +1 correspondant au site d'initiation de la transcription. La séquence du site ISRE proximal fonctionnel est précisée. De plus, l'absence des séquences consensus TATA et CAAT (« CAAT-box et TATA-box ») est soulignée.

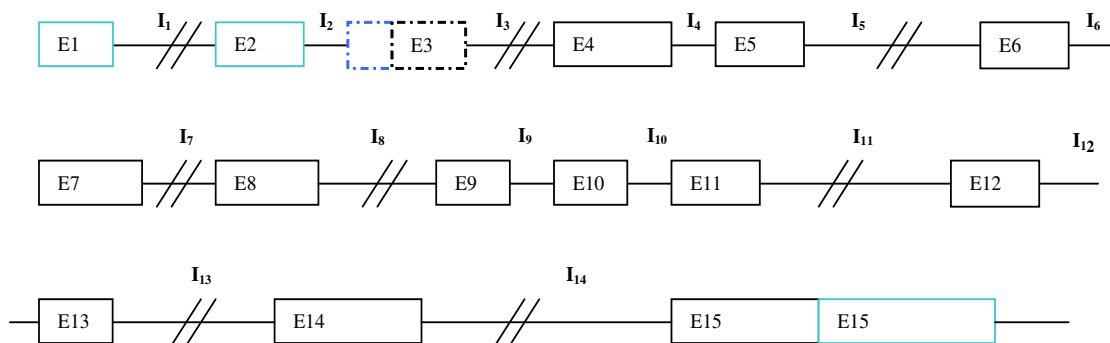


Fig. 20. Organisation générale du gène *Mx1* de *Bos taurus*. Le chromosome 1 abrite une structure génomique comprenant 14 introns et 15 exons, s'étendant sur 32200 nucléotides et définissant le gène *Mx1*. Les exons correspondant à des zones non traduites (UTR ou « Untranslated Regions ») sont encadrés en bleu. Les introns sont représentés sous forme d'une ligne simple coupée par le signe // lorsque la taille de l'insert est supérieure à 1000 pb.

I.4. OBJECTIFS

Au début de cette recherche, aucune étude n'avait démontré la capacité de la BoMX1 à interférer avec la réplication virale.

Naturellement, notre premier objectif sera de vérifier si la BoMX1 possède bien une fonction antivirale. Une lignée cellulaire capable d'exprimer conditionnellement BoMX1 sous un promoteur fort tout en se préservant des effets multiples générés par l'expression des IFNs de type I s'impose comme l'outil idéal pour cette détermination. L'établir sera notre premier souci.

Afin de tester le potentiel fonctionnel de la BoMX1, un virus canonique dont la réplication est cytoplasmique, se doit d'être soumis aux tests d'inhibition par la BoMX1. Nous avons choisi le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV).

L'espèce bovine soumise à la pression de sélection naturelle exercée par les différents biotopes qu'elle occupe, doit posséder des systèmes de défense innée contre les nombreux virus l'infectant. Parmi ceux-ci, deux représentants de la famille des *Paramyxoviridae* responsables de maladies respiratoires, le parainfluenza de type 3 bovin (Respirovirus) ou BoPI3 et le virus respiratoire syncytial bovin (Pneumovirus) ou BoRSV. La possibilité d'identifier des allèles plus efficaces contre ces virus et de les introduire chez les animaux de rente via un programme de sélection génétique, constitue la justification de notre second objectif : quantifier *in vitro* le degré de résistance conféré par la BoMX1 vis-à-vis de l'infection par ces deux virus.

Une mesure de l'activité de la BoMX1 au sein d'une population cellulaire infectée par le virus influenza A, réputé ne pas générer de maladies chez l'espèce bovine, s'impose afin d'établir une comparaison fonctionnelle avec les MX humaines et murines abondamment étudiées.

Enfin, sur base des différents résultats expérimentaux, notre dernier objectif est de progresser dans l'étude du mode d'action des protéines MX. En particulier, nous tenterons de déterminer quelles étapes du cycle réplcatif viral sont sensibles à l'interférence de la protéine BoMX1 et de proposer de nouvelles hypothèses mécanistiques.

II. Matériel et Méthodes

II.1. ASPECTS BIOLOGIQUES

II.1.1. CELLULES

Les lignées cellulaires Vero (ATCC, CCL-81) et MDBK (ATCC, CCL-22) sont mises en culture dans un milieu DMEM ("Dulbecco's Modified Eagle's Medium") supplémenté de 10% (v/v) en sérum foetal bovin (FCS) normal ou certifié exempt de doxycycline (Clontech, Palo Alto, CA). Le milieu contient également 1% (v/v) de pénicilline-streptomycine et 0.5% (v/v) d'amphotéricine B (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria). Les cellules sont incubées à 37°C dans une atmosphère humide enrichie en CO₂ (5%). Dans ces conditions de culture, elles sont utilisées pour la titration de virus ou soumises à un protocole de transformation en vue de l'établissement de lignées stables.

Les cellules BHK-1 (ATCC CCL-10) sont cultivées dans un milieu MEM (minimum essential medium) supplémenté en sérum foetal bovin (FCS) à la concentration finale de 10% (v/v) en atmosphère humide enrichie en CO₂ (5%) et maintenue à la température de 37°C.

Les cellules PBMCs (peripheral blood mononuclear cell) sont purifiées à partir de 4 ml de sang prélevés sur une vache de race Holstein et déposées sur Ficoll-Pâque (Amersham Biosciences). Après centrifugation (40g, 30 min.), la bande blanche leucocytaire est aspirée et diluée dans une solution saline isotonique. Les cellules sont centrifugées (100g, 10 min.) et le culot cellulaire remis en solution dans 2 ml de milieu de culture (RPMI). Elles sont incubées à 37°C dans une atmosphère humide enrichie en CO₂ (5%).

II.1.2. VIRUS

Les sérotypes Indiana et New Jersey du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV; *Rhabdoviridae*, *Vesiculovirus*) ont été amplifiés sur cellules BHK-21 dans les locaux

du centre d'Etudes et de Recherches Vétérinaires et Agronomiques de Bruxelles (CODA/CERVA). Le virus parainfluenza de type 3 bovin (Bo-Pi3, *Paramyxoviridae*, *Respirovirus*) est un isolat de la salle d'autopsie du service de Pathologie générale et autopsies, propagé en cellules MDBK. Le virus respiratoire syncytial bovin (BoRSV, *Paramyxoviridae*, *Pneumovirus*) est une souche vaccinale (Rispoval RS, PfizerAnimal Health, Belgique) amplifiée en cellules MDBK.

La souche du virus influenza A mis en œuvre au sein du laboratoire nous a été fournie par le Professeur Pensaert (souche A/swine/NewJersey/11/76 (H1N1).

Les virus sont stockés, par partie aliquote de 1 ml, dans des ampoules placées à -80°C.

II.2. ASPECTS MÉTHODOLOGIQUES

II.2.1. DÉTERMINATION DU TITRE VIRAL

Cette détermination est réalisée par la méthode de la dose infectieuse 50 sur culture cellulaire. (TCID₅₀ ou « *Tissue Culture Infective Dose 50* »). Le surnageant des cellules dilué de 10 en 10 dans un milieu DMEM supplémenté de trypsine (TPCK, Sigma-Aldrich) à la concentration de 2 µg/ml, dans le cas du virus Influenza A, est utilisé pour infecter des cellules permissives pour l'espèce virale titrée, à raison de 6 puits par dilution. Après une heure d'adsorption sur la monocouche cellulaire, le surnageant est enlevé et les puits sont lavés trois fois au PBS. Du milieu DMEM contenant 2% (v/v) de FCS et 0.4 % d'agarose (0.6% dans le cas de BoPi-3) est ajouté. Après un temps approprié et dépendant de l'espèce virale, le dénombrement, en fonction de la dilution, des puits exhibant un effet cytopathogène est effectué. A partir de ces données, le titre (TCID₅₀) est calculé par la méthode de Reed-Muench²⁴⁰. La technique est appliquée tant pour déterminer les titres des stocks de virus de départ que dans le calcul du potentiel antiviral de la protéine BoMX1.

II.2.2. MESURE DE LA CYTOTOXICITE PAR LA METHODE MTS

Cette méthode permet la mesure de la viabilité cellulaire via la mesure de l'activité mitochondriale. Il s'agit d'une modification de la méthode utilisant la réduction du bromure de (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltetrazolium) ou

MTT (MTT, Sigma Aldrich) en un sel insoluble.^{241,242} En effet, le test MTS ou sel de [3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulphonyl)-2H]-tétrazolium (MTS; Promega) utilise un substrat soluble dont la réduction modifie le spectre d'absorbance de la substance.²⁴³ La mesure d'absorbance à 495 nm (avec une référence à 650 nm) est effectuée au spectrophotomètre (Multiskan Spectrum ; Thermolab Systems). Pour réaliser le test, les cellules, induites ou non, sont placées en plaques 96 puits pendant 24 h dans 200 µl de milieu DMEM standard. Les puits sont infectés ou non (témoins) à la multiplicité d'infection souhaitée. A un temps déterminé par l'expérimentateur, 20 µl du réactif MTS par puits sont ajoutés et incubés pendant 1 h dans les conditions normales de culture (5% CO₂, 37°C). La mesure d'absorbance à 495 nm (avec une référence à 650 nm) est effectuée au spectrophotomètre (Multiskan Spectrum ; Thermolab Systems, Finlande).

II.2.3. IMMUNOFLUORESCENCE

Les cellules cultivées sur lamelles sont fixées à l'aide d'une solution de PBS pH 7.4 (tampon phosphate) contenant 4% (p/v) de paraformaldéhyde pendant 30 min à 4°C. Après perméabilisation des cellules par le méthanol absolu (5 min, -20°C), les sites non spécifiques sont bloqués par incubation pendant 1 h à température ambiante dans 1 ml d'un tampon (appelé tampon de lavage) de PBS enrichi d'albumine bovine (BSA, fraction V ; Sigma-Aldrich) à raison de 1% (p/v). Les cellules sont ensuite incubées à l'aide d'un anticorps primaire spécifique (ou d'un cocktail d'anticorps primaires le cas échéant) pendant 45 min à 37°C, lavées 3 fois 5 min dans le tampon de lavage, et incubées à nouveau 45 min en présence d'anticorps secondaires adéquats conjugués spécifiquement à un fluorochrome. Les cellules sont lavées 3 fois 5 min à l'aide du tampon de lavage et rincées deux fois 5 min dans du PBS. Les lamelles sont montées sur lame à l'aide du kit Prolong Antifade™ (Molecular Probes, Invitrogen, San Diego, CA). Elles sont examinées au microscope à épifluorescence (Olympus BX51) et photographiées à l'aide d'une caméra numérique DP51 (Olympus, Belgique).

II.2.4. CYTOMETRIE EN FLUX

Les cellules traitées par une solution de trypsine-EDTA sont mises en suspension dans un tampon PBS Na₂EDTA. Elles sont centrifugées (250 x g, 5 min) puis fixées pendant 30 min à 4°C dans le PBS (pH 7.4) + 4% (p/v) de paraformaldéhyde. Les cellules sont ensuite perméabilisées dans un tampon PBS

enrichi par l'ajout d'1% (p/v) d'albumine bovine (BSA, fraction V ; Sigma-Aldrich) et de 0.2% (p/v) de saponine (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO). Le marquage par les anticorps primaires et secondaires est effectué dans ce tampon selon un protocole identique à celui décrit pour l'immunofluorescence. Au terme de la réaction de marquage, les cellules en suspension sont transférées dans le tampon PBS + 0.5% (p/v) paraformaldéhyde (pH 7.4) et conservées à 4°C. L'analyse en cytométrie en flux est réalisée sur un système FACStarplus (Becton Dickinson, Belgique) et son programme CellQuest (Becton Dickinson, Belgique) ou sur le cytomètre Cytomics FC-500 et son programme d'analyse RXP (Beckman Coulter Inc. USA). La fluorescence est collectée en FL-1 et FL2 ; la sélection de la population cellulaire (au minimum 10000 événements) et l'exclusion des débris éventuels est optimisée au moyen des paramètres FSC et SSC.

II.2.5. IMMUNOMARQUAGE DES PROTEINES SUR MEMBRANE

Les cellules en plaques 6 puits sont lavées 2 fois 5 min au PBS pH 7.4. La solution de lyse bouillante (2 ml d'un tampon 1% SDS, 10 mM Tris pH 7.4) est ajoutée et incubée pendant 5 min. Le produit de la lyse est récupéré et centrifugé à 10000 x g pendant 5 min. Le surnageant est repris et une partie aliquote est diluée 10 fois. Cet échantillon est utilisé pour la détermination de la concentration en protéines par la méthode BCA qui tolère une concentration maximale de 0.1 % en SDS (Pierce, BCA™).

A partir de la connaissance de la concentration en protéines du lysat initial, une dilution appropriée permet d'obtenir une solution contenant 10 µg/10 µl. Celle-ci est diluée dans un tampon de charge 2 x concentré (125mM Tris pH 6.8, 4% SDS, 10% glycerol, 0.006% bromophenol blue, 1.8% beta-mercaptoéthanol). Après ébullition, l'échantillon ainsi préparé est analysé par électrophorèse (boîtier Xcell SureLock™ Invitrogen) en gel dénaturant de polyacrylamide (gel gradient 4-20%) sous une tension de 200 V pendant 1 h. Pour le transfert sur membrane PVDF, une tension de 30 V est appliquée pendant 1h. Le tampon de transfert est du CAPS 10 mM pH 10.5 contenant 10 % (v/v) de méthanol. Alternativement, et sans autre modification du protocole, le tampon de transfert NuPAGE (Invitrogen) a été employé.

Après le transfert, la membrane est lavée dans du tampon 10 mM Tris pH 7.8, 150 mM NaCl (TBS). La saturation des sites non spécifiques ("blocking") est réalisée dans un tampon TBS contenant 3% p/v de BSA (Sigma-Allemagne) ou,

alternativement, 10% de "Western Blocking Reagent" (Roche Diagnostics GmbH, Bâle, Suisse).

Le marquage primaire est réalisé dans le TBS + 3% p/v de BSA ou TBS + 5% de "Western Blocking Reagent" (TBSM) contenant une dilution appropriée de l'anticorps spécifique, pendant 1 h à 37°C et sous agitation. Les membranes sont lavées 2 fois dans du TBS + 0.05% v/v de Tween 20 (TBST) et 2 fois dans du TBSM.

Le marquage secondaire est réalisé par une dilution appropriée de l'anticorps secondaire couplé à la HRP pendant 1 h à 37°C. Après 4 lavages au TBST et un lavage à l'H₂O distillée, les protéines immunoréactives sont révélées par incubation en présence du substrat 3-amino-9-éthylcarbazole (AEC Dako-LSB, Carpenteria, CA.) ou du substrat chimiluminescent LumiGlo™ (Cell Signalling Technology, USA). Dans ce cas, la révélation est effectuée sur film radiographique (KODAK BioMAX MR, Amersham Biosciences, Pays-Bas).

Alternativement, le marquage secondaire est effectué à l'aide d'un anticorps couplé à la biotine (Molecular Probes, San Diego, CA), dressé contre les anticorps de lapin. Une étape supplémentaire consistant en l'incubation de la membrane à l'aide de HRP-streptavidin dans le TBSM est alors ajoutée. Les lavages et la révélation sont réalisés selon le protocole décrit ci-dessus.

II.2.6. IMMUNODETECTION

La protéine BoMX1 est marquée à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la protéine humaine (fourni gracieusement par I. Julkunen, Helsinki, Finlande) et présentant une réaction croisée vis-à-vis de la protéine homologue. D'autre part, nous avons également utilisé un antisérum de souris produit au sein de notre laboratoire à partir d'un extrait tissulaire d'une souris transgénique exprimant la BoMX1, utilisé comme immunogène et injecté à une souris possédant le même background génétique. Le virus BoPi3 est détecté à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin fourni par le CODA/CERVA (Dr. P. Kerkhofs) ou de deux anticorps monoclonaux : le premier (BioX-Diagnostics, Belgique) conjugué au FITC (isothiocyanate de fluorescéine) et le second non conjugué, dirigé contre la protéine membranaire M (Institut Pourquier, France). Le virus BoRSV est mis en évidence par un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine de fusion F (Institut Pourquier, France). Un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la dynamine-2 du rat (obtenu

auprès du Pr. Mark A. McNiven, Mayo Clinic, Rochester, USA) nous a permis de réaliser le marquage de son homologue produit par la cellule Vero.

Pour les techniques de type Western-blot, la détection immunologique est réalisée via les anticorps secondaires spécifiques couplés à la peroxydase (HRP, horseradish peroxydase). Pour les applications faisant appel à l'immunofluorescence (IF), des anticorps secondaires spécifiques couplés aux fluorochromes Alexa 488 et Alexa 568 sont mis en œuvre ; pour la cytométrie en flux (CF), les anticorps utilisés sont couplés aux fluorochromes Alexa 488 ou à la Phycoérythrine (PE).

II.2.7. VECTEURS

Vecteur de clonage

PCRII-Topo

Ce vecteur permet l'insertion directe, sans ajout de ligase, des amplicons issus de réactions PCR utilisant une polymérase possédant une activité transférase terminale consistant en l'ajout en 3' d'une adénosine-triphosphate. Le vecteur obtenu est amplifié chez *E.coli*. Purifié, il est alors utilisable pour différentes applications : réaction de séquence, sous-clonage, mutagenèse dirigée ou aléatoire, construction de vecteur d'expression par transfert de l'insert...

Vecteurs d'expression

PcDNA6/TR

Le vecteur pcDNA6/TR est un vecteur d'expression eucaryote qui possède la séquence codante pour le gène TetR (*Tétracycline Résistant*) placée sous le contrôle du promoteur constitutif CMV d'origine virale (*Cytomegalovirus* de la famille des *Herpesviridae*) stabilisé par la présence d'une séquence intronique empruntée au gène de la β -globine de lapin. Le gène porte également le gène de résistance à la blasticidine, antibiotique actif sur les cellules dès les concentrations de 6 à 8 $\mu\text{g/ml}$ (Fig.21A).

PcDNA4/TO

Ce vecteur eucaryote offre la possibilité d'un contrôle strictement régulé de l'expression d'un gène placé sous le contrôle du promoteur fort CMV. Cette régulation est réalisée par le truchement de deux copies de l'opérateur TetO2 insérées en aval du promoteur, structure qui l'empêche de se fixer aux séquences de l'opérateur « Tet ». Le vecteur pcDNA4/TO peut être utilisé en binôme avec le pcDNA6/TO puisqu'il est porteur d'un gène de résistance différent, en l'occurrence celui de la zéocine (Fig.21B).

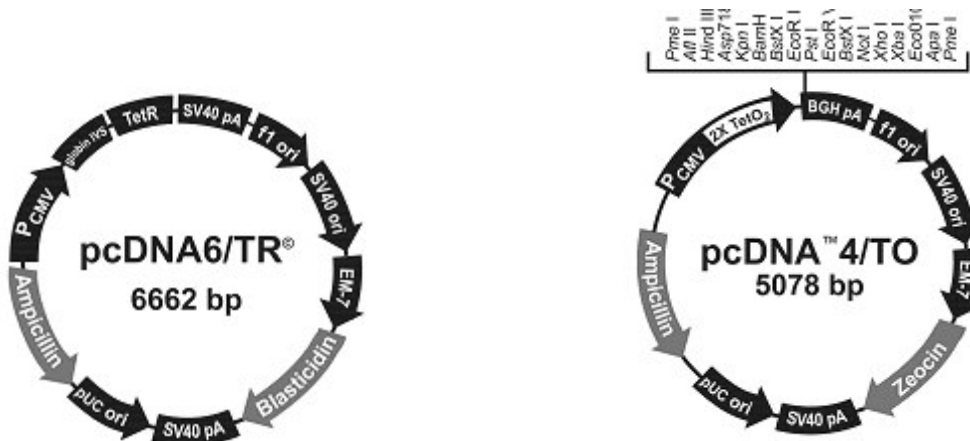


Fig. 21. Vecteur pcDNA6/TR répresseur (A) et vecteur pcDNA4/TO (B). Le pcDNA6/TR exprime de façon constitutive le répresseur TetR. Le pcDNA4/TO possède, insérées au niveau du promoteur, deux copies de l'opérateur Tet ($TetO_2$) qui sont reconnues par le répresseur TetR.

Mécanisme de la régulation dans le système T-REX

Les deux vecteurs associés forment un ensemble permettant de créer une unité de régulation stricte de l'expression sous un promoteur fort. Ce système est connu sous le nom de T-REX.

En l'absence de tétracycline, la protéine TetR (répresseur) exprimée par le plasmide pcDNA6/TR va former un homodimère ayant une grande affinité pour l'opérateur TetO2 situé sur le promoteur du pcDNA4/TO. Deux homodimères vont ainsi réprimer l'expression du gène d'intérêt. L'ajout de tétracycline au milieu de culture aura pour effet de lever la répression. La tétracycline possède une grande affinité pour chaque protéine TetR ; lors de sa fixation, l'antibiotique induit une modification de la conformation de TetR et, par voie de conséquence, son détachement de l'opérateur TetO2.

II.2.8. PREPARATION DU CDNA CODANT POUR BOMX1

Purification de l'ARN total

Les cultures de cellules MDBK en plaques 6 puits (Greiner) sont stimulées par de l'interféron α (IFN α) pendant 24 h. L'ARN total est alors extrait par le TRIzol™ (Total RNA Isolation; Invitrogen, Belgique) selon les recommandations du fabricant. Brièvement, les cellules lavées au PBS sont soumises à l'action du réactif TRIzol™. Après une incubation de 5 min à température ambiante, une extraction au chloroforme permet de récupérer l'ARN dans la phase aqueuse. Une précipitation à l'isopropanol (IPA) suivie d'une centrifugation permet de récupérer un culot constitué d'ARN. Lavé à l'éthanol 75%, celui-ci est séché et finalement dissout dans de l'H₂O traitée préalablement au DEPC.

D'autre part, 4 ml de sang prélevés sur une vache de race Holstein sont déposés sur 3 ml de Ficoll-Paque (Amersham Biosciences). Après centrifugation (400 g, 30 min), la bande blanche correspondant aux cellules leucocytaires est aspirée et diluée dans une solution saline balancée. Après une nouvelle centrifugation (100 g, 10 min), le culot cellulaire est remis en solution dans 2 ml de milieu de culture (RPMI) et incubé à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂, saturée en H₂O.

Les PBMC dès leur mise en incubation dans le milieu RPMI sont stimulés à l'aide du poly I : C à une concentration de 50 μ g/ml. Cette stimulation d'une durée de 12 h se termine par l'extraction de l'ARN total selon le protocole décrit ci-dessus.

Transcription inverse et PCR

L'ARN total (2 μ g, 5 μ l) est incubé, en présence d'amorces oligo(dT)₁₈ (0.5 μ g/ml, 1 μ l) et de 6 μ l d'H₂O DEPC, pendant 10 min à 68°C, puis transféré sur glace 5 min. Après ajout de 4 μ l du tampon de réaction (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT), de l'inhibiteur de RNase (Riboblock, 1 μ l, 20 U/ μ l) et de dNTP (10mM, 2 μ l), la réaction est incubée à 25°C pendant 5 min. En présence de transcriptase inverse (1 μ l, ImpromII™ Promega, USA), la réaction est incubée à 42°C pendant 60 min. La réaction est stoppée par dénaturation thermique (70°C, 10 min) et transférée sur glace.

L'amplification par PCR est réalisée en utilisant 1 μ l du produit de la transcription inverse.

Le milieu réactionnel est celui recommandé par le fournisseur de l'Elongase™ (Invitrogen, San Diego, CA), un mélange des polymérase "Taq DNA Polymerase" et "Pyrococcus species GB-D DNA polymerase".

Les couples d'amorces utilisés pour l'amplification du cDNA de BoMx1A sont :

Couple 1

- **BOSTART**: 5'-GAG CTC TGC ATT TCT GCC AAC-3' ("Forward")

- **BOSTOP**: 5'-GCA TCT GTG AAA CGG GCA GT-3' ("Reverse")

Couple 2

BOSTARTBIS: 5'-GGT ATA TTG AGG AAG AAG ATG GT-3' ("Forward")

BOSTOPBIS: 5'-GTC AGC CCG GGA ACT TG-3' ("Reverse")

Les paramètres de la PCR sont repris dans le tableau 5.

Tableau 5. Paramètres de la réaction de PCR destinée à amplifier la séquence codante de BoMX1

Etapes	Température	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	94°C	5 min	x1
Dénaturation	94°C	30 s	
Hybridation	62°C + 0.1°C/ cycle	30 s	x10
Elongation	68°C	2 min	
Dénaturation	94°C	30 s	
Hybridation	64°C	30 s	x25
Elongation	68°C	2 min 20s+10s/cycle	
Elongation finale	68°C	10 min	x1

Construction du vecteur PCRII-TOPO-BoMX1

Les amplicons issus de la PCR sont purifiés par chromatographie (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN Benelux, Pays-Bas) et clonés dans le vecteur pCRII-TOPO (Invitrogen, San Diego, CA) selon les recommandations du fournisseur. Brièvement, des bactéries *E.coli* Top10 compétentes sont maintenues sur glace en présence du produit de ligation. Un choc thermique induit la transformation des

bactéries qui, sur milieu sélectif, vont former des colonies. Celles-ci sont analysées par PCR à l'aide des amorces T7 et Sp6. Les bactéries de colonies positives sont amplifiées en phase liquide (milieu sélectif contenant 30 µg/ml de kanamycine). Une analyse par restriction des vecteurs extraits des cultures ("mini-prep") permet de confirmer la présence d'une insertion dont la séquence est analysée. La sélection d'un vecteur possédant un insert conforme définit le vecteur PCRII-TOPO-BoMX1.

Réaction de séquence

La réaction de séquence est une modification de la réaction générale de Sanger. Elle utilise des didéoxynucléotides marqués par un fluorophore spécifique (ABI Bigdye terminator). Le protocole mis en œuvre est celui recommandé par le fabricant (Applied Biosystems, Foster City, CA). L'analyse électrophorétique est réalisée sur un séquenceur de type "3730 Genetic Analyzer" (Applied Biosystems, Foster City, CA). La stratégie de séquençage a nécessité l'emploi de 8 amorces dans le sens direct et 8 amorces dans le sens inverse (Tableau 6). Les résultats ont été comparés à la séquence du gène BoMX1 (Genbank # U88329) par le programme BLAST.²⁴⁴

Construction du vecteur pcDNA4-BoMX1

Le pCRII-TOPO-BoMx1 est soumis à l'action des enzymes de restriction *HindIII* et *EcoRV* (Fermentas). Le fragment libéré est purifié à partir d'un gel d'agarose (Gel extraction kit - Qiagen). Le fragment est rendu "bout franc" par l'action d'une polymérase, la *Pfu* et inséré dans le vecteur pCDNA4 par action de la T4 ligase.

L'analyse des clones est effectuée par PCR à l'aide d'une amorce ("forward") correspondant au "CMV forward priming site" (5'-GCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3'), présent au niveau du promoteur du pcDNA4/TO et d'une amorce ("reverse") interne au gène d'intérêt. La taille du produit PCR permet de déterminer l'orientation de l'insertion.

Tableau 6 : amorces oligonucléotidiques des réactions de séquence appliquées à BoMx1A

Numéro	Nom	Séquence
1	M13 reverse	Caggaaacagctatgac
2	BoMx5.1 UP	Gaagagaaggtgcccctgcatt
3	Exon5 sens	Cacgtcccagatctgaccct
4	exon7 sens	Gtggacgtggtgagaaacct
5	exon9 sens	Aaactctgccctgttgaa
6	exon11 sens	Aaatcggtatcgtggcagag
7	exon13 sens	Actccaatcccaggtctca
8	exon4 rev	Gtccaggaagctgactttgc
9	exon6 rev	Tatggtcctgtgagaaacct
10	exon10 rev	Ctcaaccacagcactccattt
11	exon13 rev	Gtacacctggtcctggcagt
12	BoMx3.2-ElliDO	Gaacttctcttctctctggtgctc
13	M13 forward	Gtaaaacgacggccag

Transfection transitoire

Un complexe Lipofectamine/vecteur-insert et lipofectamine/vecteur (témoin) est constitué selon les recommandations du fournisseur (Lipofectamine™ 2000, Invitrogen, San Diego, CA). Le complexe (100 µl) fraîchement préparé est mis en présence des cellules à une concentration de 2.5 µg/5 µl (plaques 6 puits) ou 0.75 µg/2µl (plaques 24 puits) pendant 24 h.

Pour les études d'expression de la protéine d'intérêt, les cellules sont marquées par immunofluorescence ; pour les études de résistance à l'infection virale, les cellules sont infectées par le virus, avant d'être soumises à un double marquage en immunofluorescence pour la mise en évidence de la BoMX1 (ou de la protéine d'intérêt) et d'une protéine virale.

Etablissement d'une lignée cellulaire polyclonale Vero exprimant le répresseur TetR

L'établissement de clones stables comprend trois étapes : linéarisation du vecteur d'expression, transfection de cellules Vero et sélection de clones stables.

Le vecteur pcDNA6/TR est linéarisé par l'enzyme de restriction FspI dont la séquence reconnue (5'- TGC | GCA-3') est unique et se situe au niveau du gène de résistance à l'ampicilline.

La transfection est effectuée à l'aide de la lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, San Diego, CA) sur des cultures de cellules VERO placées en plaque 6 puits, selon le protocole recommandé par le fabricant. Brièvement, 5 µg du vecteur linéarisé sont incubés en présence 12 µl de lipofectamine™ 2000 pendant 40 minutes. Le complexe lipofectamine/ADN est ensuite placé au contact des cellules pendant 5 heures dans un milieu DMEM sans antibiotique et sans sérum. Il est ensuite remplacé par un milieu complet contenant des antibiotiques et 10% de FCS.

Quarante-huit heures après la transfection, l'antibiotique est ajoutée au milieu de culture à une concentration spécifique. La pression de sélection est maintenue pour une durée dépendant de la nature de l'antibiotique. Parallèlement, une culture de cellules Vero non transformées est soumise à l'action du même antibiotique, dans les mêmes conditions. L'ensemble du procédé de sélection est effectué en plaques T25. Les cellules sont lavées et le milieu remplacé tous les 3 jours.

Etablissement d'une lignée cellulaire exprimant BoMX1

Etablissement d'une population polyclonale inductible

Les vecteurs sont linéarisés avant d'être introduits en cellules Vero-pcDNA6, en phase de croissance (<60% de confluence), par électroporation. La quantité de vecteur utilisée est de 15 µg. Les paramètres électriques appliqués sont une tension de 0.25 kV, une capacité de 950 µF ; la constante de temps indiquée par l'appareil (électroporateur BioRad) est de 33 ms.

Les cellules sont transférées en plaques 6 puits, immédiatement après électroporation, dans un milieu DMEM enrichi en sérum fœtal de veau (10% FCS). Vingt-quatre heures plus tard, un milieu de sélection contenant de la blasticidine (10

$\mu\text{g/ml}$) et de la zéocine (300 $\mu\text{g/ml}$) est appliqué aux cellules Vero-pcDNA6 transformées par les vecteurs pcDNA4 et pcDNA4-BoMx1. Ces conditions de sélection sont maintenues pendant trois semaines pour le système inductible.

L'évaluation du taux d'expression de la population polyclonale est réalisée au moyen de la technique d'immunofluorescence.

Etablissement d'une lignée cellulaire Vero-pcDNA6-pcDNA4-BoMX1

Les cellules polyclonales Vero-pcDNA6/pcDNA4-BoMx1A résistantes à la zeocine et à la blasticidine sont maintenues en culture (flacon T75) jusqu'à 90% de confluence. Après traitement à la trypsine, le nombre de cellules viables présentes dans la suspension (suspension I) est déterminé par la méthode du bleu Trypan en cellules de Thomas.²⁴⁵ Une partie aliquote appropriée est diluée dans 10 ml de milieu DMEM (suspension II). Cette dernière est à nouveau diluée 400 fois (100 μl dans 40 ml) à l'aide d'un milieu de culture enrichi en cytokines. Cet enrichissement est obtenu par addition d'un milieu de culture préalablement utilisé pour la culture de cellules Vero. Après filtration sur 0.22 μm , il est ajouté à raison de 50% (v/v) au milieu de culture DMEM complet (serum + antibiotique) pour la croissance initiale des clones. Au terme du processus de dilution, 1 cellule sera statistiquement présente par 200 μl de milieu.

Quatre boîtes de 96 puits sontensemencées (200 μl /puits). Le renouvellement du milieu sélectif est effectué toutes les 48 heures. L'expression potentielle de BoMX1 par les différents clones obtenus est visualisée par immunofluorescence avec et sans stimulation à la tétracycline (2 $\mu\text{g/ml}$). Ceux qui sont retenus sont soumis à un deuxième cycle de clonage selon un procédé identique.

II.2.9. CONTROLE DE L'INHIBITION EPIGENETIQUE

Détermination des doses non toxiques de TSA et de 5-AZA

La TSA (Trichostatine A, Sigma-Aldrich) et la 5-AZA (5-Azacytidine, Sigma-Aldrich), substances respectivement inhibitrices des histones déacétylases et des méthyltransférases, présentent une certaine toxicité pour laquelle le seuil doit être déterminé pour chaque type cellulaire. A partir des solutions stock de 5-AZA (5 10^{-4} M) et de TSA (15 mM), une gamme couvrant les concentrations 0 μM à 150 μM pour

la 5-AZA et de 0 nM à 150 nM pour la TSA est appliquée à des cellules Vero-pcDNA6 cultivées en plaques 24 puits en présence d'un milieu DMEM + 2% FCS. La viabilité cellulaire par rapport aux témoins est déterminée par la méthode du bleu Trypan.²⁴⁶

Essai d'activation de la transcription de BoMx1

Des clones en voie d'extinction sont transférés sur lamelles et mis en culture dans les conditions standard en présence de 10 μ M de 5-AZA et/ou de 40 nM de TSA pour une période s'étalant de 1 à 6 jours selon les modalités reprises dans le tableau ci-dessous. Après induction de l'expression par la doxycycline (1 μ g/ml) pendant 24 heures, les cellules sont fixées à l'aide d'une solution de paraformaldéhyde 4% et analysées par immunofluorescence pour l'expression de BoMX1.

Tableau 7. Schéma expérimental de l'étude de la toxicité de la 5-AZA et de la TSA

Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5	Jour 6
Cellules	Cellules	Cellules	Cellules	Cellules	Cellules
Cellules + AZA	Cellules + AZA	Cellules + AZA	Cellules + AZA	Cellules + AZA	Cellules + AZA
Cellules + TSA	Cellules + TSA	Cellules + TSA	Cellules + TSA	Cellules + TSA	Cellules + TSA
Cellules + TSA + AZA	Cellules + TSA + AZA	Cellules + TSA + AZA	Cellules + TSA + AZA	Cellules + TSA + AZA	Cellules + TSA + AZA

Suivi cinétique de l'expression de BoMX1

Une plaque de 24 puits estensemencée à l'aide de 15000 cellules/puits dans un milieu DMEM standard. Lorsque les cellules sont à 90% de confluence, l'inducteur doxycycline (1 μ g/ml) est ajouté pendant 24 h sauf pour les puits témoins. Le milieu est ensuite lavé trois fois au PBS et remplacé par le milieu standard. La mise en évidence par immunofluorescence de la présence de BoMX1 est réalisée après fixation au paraformaldéhyde (3% v/v). La cinétique est établie pour une période de 6 jours à raison de deux échantillons induits et deux témoins par 24 heures.

Alternativement, l'expression de BoMX1 a été suivie par cytométrie en flux. Des cellules du clone sélectionné, induites ou non, pendant 24 heures, par la doxycycline, sont analysées par cytométrie en flux 1h, 24h, 48h et 72h après transfert dans un milieu sans inducteur. Les anticorps primaires anti-boMX1 sont révélés par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa488. Les cellules (10000 événements) sont analysées par le cytomètre en flux Cytomics™ FC-500 (Beckman Coulter Inc., Sunnyvale,CA).

II.2.10. NORTHERN BLOTTING

Préparation des sondes radioactives ARN

RT-PCR

A partir de l'ARN total extrait (1 µg) de cellules infectées pendant 6 heures par le virus Influenza A H1N1, un fragment du gène NP est amplifié par RT-PCR. La transcription inverse est réalisée selon le protocole déjà décrit (§8b) à l'exception du type d'amorce mis en œuvre, en l'occurrence l'amorce spécifique : NPrev 5'-GAT GCC CTC TGT TGA TTG GT-3' (20 pmol). La PCR est réalisée à l'aide du couple d'amorces :

Psens : 5'-TGC TTC AAA ACA GCG AAG TG-3'.

NPrev : 5'-GAT GCC CTC TGT TGA TTG GT-3'.

Les paramètres de la PCR sont : dénaturation initiale à 94°C pendant 3 min (1 cycle) ; dénaturation à 94°C 45 s, hybridation à 55°C 45 s, élongation à 72°C 30 s (36 cycles) ; élongation finale à 72°C pendant 1 s (1 cycle). Le milieu de réaction est celui défini par le "Master Mix" (Applied Biosystems). La quantité de matrice de départ est inconnue : nous avons utilisé 0.2 µl du produit de la transcription inverse. Après analyse sur gel d'agarose, le produit de PCR est purifié et cloné dans le vecteur PCRII-TOPO.

Après sélection de clones recombinants et amplification, les vecteurs que nous avons dénommé PCRII-TOPO -NP' (NP' = fragment NP), sont orientés au moyen de deux PCR utilisant les couples M13Rev et NPsens et M13Fwd et NPrev. Un vecteur est sélectionné et vérifié par séquençage. Enfin, les deux réactions de PCR réalisées pour l'orientation de l'insert sont optimisées et les produits de PCR, après digestion à

la DPNI, sont purifiés sur colonne Invitex (PCR purification Kit, Westburg, Pays-Bas).

Transcription *in vitro*

Les deux fragments de PCR purifiés sont utilisés comme matrice pour la transcription *in vitro* qui permet de générer les sondes froides et chaudes. Cette synthèse est réalisée à l'aide du kit "Durascribe" (Epicentre Technologie, Pays-Bas); il contient les deux ARN polymérases SP6 et T7 que nous utilisons pour la synthèse de la sonde NP+ (ARN+) ou NP- (ARN-). Succinctement, 120 ng de matrice (5 µl) sont incubés pendant 12 h en présence de SP6 (NP-) ou de T7 polymérase (NP+) selon les indications du manuel "Durascribe". Après digestion à la DNase (15 min à 37°C), le produit de transcription est analysé sur gel de polyacrylamide. Les sondes chaudes sont synthétisées selon le même protocole mais, dans le milieu de réaction, 80% du rGTP froid est remplacé par du rGT³²P (50 µCi) (Amersham).

Extraction de l'ARN cellulaire

L'ARN total est extrait d'environ 8 10⁵ cellules Vero à l'aide du kit d'extraction « SV Total RNA Isolation System™ » (Promega) selon les indications du fournisseur. En résumé, les cellules sont récupérées, après action d'une solution de trypsine-EDTA, dans 1 ml de PBS. Après centrifugation, le culot cellulaire est resuspendu dans 25 ml de PBS froid. Après une nouvelle centrifugation, 175 µl de tampon de lyse sont ajoutés au culot. Le produit de lyse est dilué dans 350 µl de tampon et incubé à 70°C pour 3 min. La solution obtenue est centrifugée à 14000 g pendant 10 min à température ambiante. Le lysat, après ajout de 200 µl d'éthanol à 95%, est transféré sur colonne chromatographique (Spin column). Après l'étape de fixation et les différents lavages, l'ARN est élué dans un tampon 1 mM Tris pH 7.0 "RNase-free".

La concentration en ARN de chaque échantillon est déterminée par analyse spectroscopique (ND 1000 Nanodrop, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA); la qualité de l'extraction est estimée par analyse sur gel d'agarose et coloration au bromure d'éthidium.

Electrophorèse

Le gel d'agarose 1% (14 x15 cm) est préparé dans le tampon MOPS (20 mM MOPS, 5 mM sodium acetate, 1 mM EDTA) auquel est ajouté du formaldéhyde

(0.6 M final). Le tampon de cuve est le MOPS rendu 0.2 M en formaldéhyde. L'échantillon (2 µg d'ARN total "spiké" par 400 pg de sonde froide NP+) est dilué dans le tampon de charge (MOPS, 18,5% formaldéhyde, 50% formamide désionisée, 4% Ficoll400, 0.1 % bromophenol blue), chauffé 5 min à 90°C et refroidi sur glace. L'électrophorèse est réalisée sous une tension de 40 V et est arrêtée lorsque le bleu de Bromophenol est à 1 cm de la fin du gel.

Transfert

Le gel est rincé trois fois dans de l'H₂O "RNase free". Le transfert est effectué sur membrane N-HYBOND à l'aide d'un "vacuum blotter" (Masterblot, Labortetknic GmbH) dans un tampon 10 x SSC (1.5 M NaCl, 0.15 M citrate sodique, pH 7.0) pendant 3 heures. Après un rinçage rapide dans un tampon 2 x SSC, les acides nucléiques sont fixés sous lumière ultra-violette à 254 nm pendant 2 min (Stratalinker, Stratagene), et placés au four à 80°C pendant 1 h.

Hybridation

La membrane est préhybridée pendant 3 h à 42°C dans 10 ml de tampon de préhybridation (Ultrahyb™, Ambion). La sonde radioactive est chauffée pendant 3 min à 95°C, refroidie en glace et ajoutée au tampon d'hybridation. Après une incubation de 12 h à 42°C, la membrane est lavée dans un tampon SSC 2x pendant 15 min à température ambiante, puis 2 fois dans SSC 2x, 0.1 % de SDS à 65°C et finalement dans 0.1x SSC, 0.1% SDS à 65°C. La membrane est ensuite révélée par autoradiographie.

II.2.11. ANALYSE PAR EXTENSION D'AMORCES

Nature des amorces

La technique mise en œuvre ici est inspirée des travaux de Vrede *et al.*²⁴⁶ L'amorce est complémentaire du brin négatif du vRNA (fragment NS1) du virus H1N1 dont nous avons vérifié préalablement la séquence. Une amorce complémentaire (contrôle négatif) est également dessinée. L'amorce dont la séquence correspond à l'extrémité 3' de la séquence codant pour NS1 (et donc complémentaire à l'extrémité 5' de l'ARN génomique viral) a été nommée vRNANS1 ; l'amorce complémentaire

cRNANS1. Remarquons que cette dernière peut théoriquement amplifier un fragment correspondant pratiquement à la taille du gène (soit 750 bases environ) mais en pratique celui-ci n'est pas visualisé. La séquence de nos amorces est :

vRNANS1 : 5'-TTGAGAAGTGCGGCAAAAATT-3'

cRNANS1 : 5'-AATTTTTGCCGCACTTCTTCAA-3'

Marquage des amorces

Les amorces purifiées par électrophorèse en gel de polyacrylamide (Isogen) sont diluées à la concentration de 10 pmoles/ μ l. Pour la réaction de marquage, 1 μ l de l'amorce est incubée 10 min à 37°C en présence de 1 μ l du tampon T4 polynucléotide kinase (Fermentas), de 4 μ l (40 μ Ci) de gamma-ATP³², de T4 polynucléotide kinase (10 U) et de 3 μ l d'H₂O "RNase free". La réaction est inactivée par chauffage à 90°C pendant 3 min. Après refroidissement, le volume est porté à 100 μ l.

Réaction d'hybridation

La concentration en ARN total des échantillons purifiés à partir de cellules Vero103 infectées ou non, stimulées ou non, est déterminée par analyse spectroscopique (Nanodrop, Nanodrop Technologies). Après normalisation, 2 μ g d'ARN total sont mis en présence de 200 femtomoles (2 μ l) d'amorces spécifiques marquées, dans un volume total de 20 μ l. Le mélange est porté à 70°C pendant 5 min avant son transfert immédiat sur glace. De l'ARN extrait d'un stock de virus (contrôle positif) est traité dans les mêmes conditions.

Réaction d'extension

Dans l'ordre, sont ajoutés, toujours sur glace, 2 μ l de dNTP (10 mM) "RNase free", 6 μ l du tampon de la "ReverseSuperscript III" et 1 μ l de RNasin. Après 10 min d'incubation à 37°C, 1 μ l de "ReverseSuperscript III" est ajouté. Le milieu réactionnel est incubé 60 min à 42°C. La réaction est inactivée par transfert à 95°C pendant 5 min.

Analyse des produits d'extension

Le produit d'extension (1 μ l) est dilué dans 10 μ l d'un tampon de charge (80% formamide, 10 mM EDTA-Na₂ (pH8.0) et 0.025% de bleu de bromophenol). L'analyse par électrophorèse (180 volts, 2 h) est réalisée en gel dénaturant 6%

acrylamide, 8M urée dans un tampon TBE (90 mM Tris-Borate, 2 mM EDTA, pH 8.3)²⁴⁷. Le gel est révélé par autoradiographie (KODAK BioMAX MS, Amersham Biosciences, Pays-Bas).

II.1.12. QRT-PCR

L'ARN total de cellules V103 stimulées ou non est purifié à l'aide du kit Invisorb (Westburg, Pays-Bas) selon les recommandations du fabricant, 3 h après infection par le virus *Influenza A H1N1* à la MOI de 1. La cycloheximide (CHX), lorsqu'elle est utilisée, est ajoutée, 1 h avant infection à la concentration finale de 100 µg/ml. La concentration en ARN total des échantillons purifiés est quantifiée par spectrométrie (Nanodrop, Nanodrop Technologie). La transcription inverse (IMPROM II™ Promega) appliquée sur 300 ng d'ARN est réalisée à l'aide d'une amorce oligodT. Une PCR de contrôle est effectuée sur chacun des produits de la RT à l'aide des amorces :

NPqrt forward 5' -CCAAATGAAAACCCAGCCTA-3'

NPqrt reverse 5' -AGTCCAATGGCTTCCACATTCT-3'

L'amplicon généré à partir de ces dernières correspond à un fragment (154 pb) de la nucléoprotéine NP.

Une sonde fluorescente FAM (reporter) - TAMRA (quencher) correspondant à la séquence interne 5' –AAGTGATTCCAAGAGGAAAGCTTTCCACAA-3' (nucléotides 85 à 114) du fragment de 154 pb est synthétisée pour la PCR quantitative proprement dite selon le principe Taqman. Les paramètres de la réaction réalisée dans le tampon "Absolute™ QPCR MIX" (Abgene, Royaume-Uni) sont repris ci-dessous :

Activation enzymatique	95°C	15 min	} 40 cycles
Dénaturation	94°C	20 s	
Hybridation	57°C	1 min	
Extension	72°C	30 s	

La concentration des amorces est fixée à 0.4 µM (forward et reverse) ; celle de la sonde est de 0.5 µM. Un contrôle interne des échantillons est assuré par une PCR sur l'ARN 18S à l'aide d'une sonde utilisant une sonde rRNA VIC™ (TaqMan®

Ribosomal RNA Control Reagents). Les données de fluorescence sont recueillies à l'aide du software SDS 2.2 (Taqman) et analysées par le qBASE (Logiciel libre développé par Jan Hellemans & Jo Vandesompele. Universitair Ziekenhuis Gent - Hôpital universitaire de Gand. [Http://medgen.ugent.be/qbase](http://medgen.ugent.be/qbase))

III. Résultats

III.1. EXPRESSION CONDITIONNELLE STABLE DE BOMX1 EN CELLULES VERO

III.1.1. CLONAGE DU CDNA DE BOMX1

L'ARN total, purifié à partir de cellules MDBK (RT1) stimulées à l'interféron α , de PBMC stimulées au poly I:C (RT2) et de cellules Vero naïves non stimulées (RT3), est soumis à une transcription inverse. Les produits en résultant sont amplifiés au moyen de quatre réactions de PCR. Trois sont réalisées avec les amorces BoSTART-BoSTOP (couple A), BoSTARTBIS et BoSTOPBIS (couple B), β Actine1 et β actine2 (contrôle positif) et une quatrième (contrôle négatif) sans amorce.

Au total, nous obtenons 12 réactions de PCR dont le résultat est repris sur la photo ci-dessous.

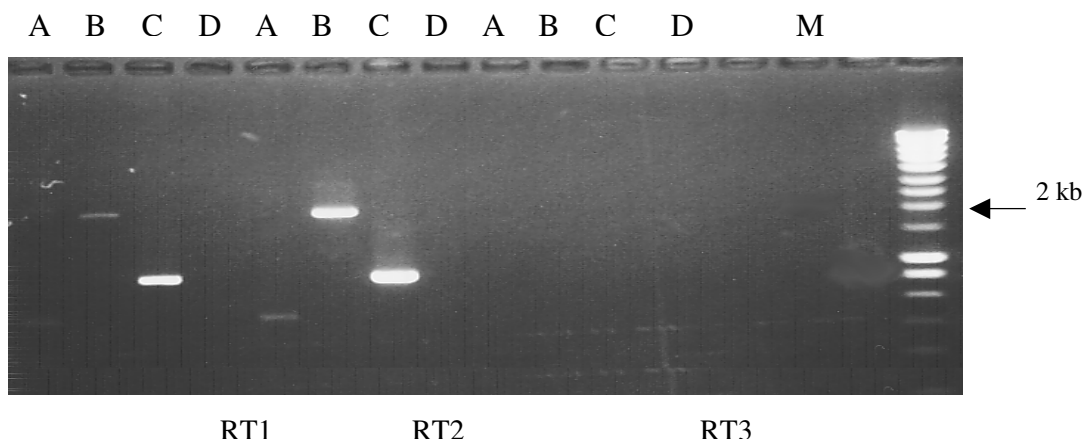


Fig 22 : Analyse sur gel d'agarose 1% du cDNA de BoMX1. Les réactions de RT-PCR réalisées pour l'amplification de BoMX1 à partir de PBMC stimulés au poly I:C (RT1), de cellules MDBK stimulées à l'interféron α (RT2) et de cellules Vero non stimulées (RT3). Les PCR ont été réalisées avec les amorces BoSTART-BoSTOP(A), BoSTARTBIS-BoSTOPBIS (B), β Actine1 et 2, et sans amorce (D). La RT-PCR obtenue à partir des cellules PBMC (RT1) et celle à partir des cellules MDBK (RT2) à l'aide des amorces BoSTARTBIS-BoSTOPBIS (B) fournit des amplicons de taille attendue (1947 pb). On remarquera l'intensité du fragment obtenu à partir des cellules MDBK.

M : marqueur de poids moléculaire.

III.1.2. SEQUENCE DU CDNA BOMX1

L'amplicon boMX1 obtenu à partir des cellules MDBK est inséré dans un vecteur pCRII TOPO. Deux clones (2 et 15) sont séquencés à l'aide de 11 amorces dessinées sur base de la séquence déposée (U88329). Le recouvrement permet d'obtenir une séquence complète. L'analyse par « Blastn » (NCBI) montre une seule substitution silencieuse au niveau nucléique en position 1212 (T→C). La séquence protéique est parfaitement conservée (Fig. 24).

III.1.3. CONSTRUCTION DU PCDNA4-BOMX1

Le pCRII-TOPO-BoMX1 est traité par les enzymes de restriction *HindIII* et *EcoRV*. Il est purifié sur gel d'agarose et rendu bout franc par action de la polymérase *Pfu*. L'insert ainsi préparé est inséré dans le pCDNA4 linéarisé (restriction *EcoRV*) et déphosphorylé. La détection des clones et leur orientation est réalisée par PCR à partir de deux amorces, l'une sur le vecteur du côté promoteur, l'autre au niveau de l'insert. La taille attendue est de 1117 pb. Nous obtenons environ 50% des clones recombinants présentant la bonne orientation. La taille du vecteur est vérifiée par l'action de *BamHI*, enzyme dont le site de reconnaissance est présent au niveau du MCS du vecteur pCDNA4, absent de la séquence BoMX1. Deux réactions de séquence utilisant les amorces M13 Forward et M13 Reverse du vecteur confirment l'orientation et la nature de l'insert. Après amplification et purification, le pCDNA4-BoMX1 ainsi caractérisé est employé dans les expériences de transfection ou d'électroporation de cellules Vero.

GGTATATTGAGGAAGAAG	ATG	GTT	CAT	TCT	GAC	TTG	GGT	ATC	GAA	GAA	CTT	GAT	54				
	M	V	H	S	D	L	G	I	E	E	L	D	12				
TCA	CCT	GAA	TCC	AGT	CTA	AAT	GGA	AGT	GAA	GAT	ATG	GAG	TCC	AAG	AGC	AAC	105
S	P	E	S	S	L	N	G	S	E	D	M	E	S	K	S	N	29
CTG	TAC	AGC	CAA	TAT	GAA	GAG	AAG	GTG	CGG	CCC	TGC	ATT	GAC	CTC	ATC	GAC	156
L	Y	S	Q	Y	E	E	K	V	R	P	C	I	D	L	I	D	46
TCC	CTG	CGG	TCC	CTG	GGC	GTG	GAG	CAG	GAC	CTG	GCC	CTG	CCC	GCC	ATC	GCT	207
S	L	R	S	L	G	V	E	Q	D	L	A	L	P	A	I	A	63
GTT	ATC	GGG	GAC	CAG	AGC	TCG	GGC	AAG	AGC	TCT	GTG	CTG	GAG	GCC	CTG	TCT	258
V	I	G	D	Q	S	S	G	K	S	S	V	L	E	A	L	S	80
GGG	GTC	GCC	CTC	CCC	AGG	GGC	AGT	GGT	ATT	GTT	ACA	AGA	TGT	CCT	CTT	GTG	309
G	V	A	L	P	R	G	S	G	I	V	T	R	C	P	L	V	97
CTG	AGG	CTG	AAA	AAA	CTT	GGG	AAT	GAA	GAC	GAG	TGG	AAA	GGC	AAA	GTC	AGC	360
L	R	L	K	K	L	G	N	E	D	E	W	K	G	K	V	S	114
TTC	CTG	GAC	AAA	GAG	ATT	GAG	ATT	CCA	GAT	GCT	TCA	CAG	GTG	GAA	AAG	GAA	411
F	L	D	K	E	I	E	I	P	D	A	S	Q	V	E	K	E	131
ATC	AGT	GAA	GCC	CAG	ATT	GCC	ATC	GCT	GGG	GAA	GGC	ACG	GGG	ATC	AGT	CAT	462
I	S	E	A	Q	I	A	I	A	G	E	G	T	G	I	S	H	148
GAG	CTG	ATT	AGT	CTG	GAG	GTC	AGC	TCC	CCT	CAC	GTC	CCA	GAT	CTG	ACC	CTG	513
E	L	I	S	L	E	V	S	S	P	H	V	P	D	L	T	L	165
ATA	GAC	CTT	CCT	GGC	ATC	ACC	AGG	GTT	GCT	GTG	GGC	AAC	CAG	CCA	CCC	GAC	564
I	D	L	P	G	I	T	R	V	A	V	G	N	Q	P	P	D	182
ATT	GAA	TAT	CAG	ATC	AAG	TCT	CTC	ATC	AGG	AAG	TAT	ATC	CTT	AGG	CAG	GAG	615
I	E	Y	Q	I	K	S	L	I	R	K	Y	I	L	R	Q	E	199
ACC	ATC	AAC	TTG	GTG	GTG	GTC	CCT	GCT	AAC	GTG	GAC	ATC	GCT	ACC	ACA	GAG	666
T	I	N	L	V	V	V	P	A	N	V	D	I	A	T	T	E	216
GCG	CTG	CGC	ATG	GCT	CAG	GAG	GTG	GAC	CCC	CAA	GGA	GAC	AGG	ACC	ATA	GGA	717
A	L	R	M	A	Q	E	V	D	P	Q	G	D	R	T	I	G	233
ATC	TTG	ACA	AAG	CCC	GAT	CTG	GTG	GAC	AAA	GGT	ACA	GAA	GAC	AAG	GTC	GTG	768
I	L	T	K	P	D	L	V	D	K	G	T	E	D	K	V	V	250
GAC	GTG	GTG	AGA	AAC	CTG	GTT	TTC	CAC	CTG	AAG	AAG	GGC	TAC	ATG	ATC	GTC	819
D	V	V	R	N	L	V	F	H	L	K	K	G	Y	M	I	V	267
AAG	TGC	CGT	GGC	CAG	CAG	GAC	ATC	AAG	CAT	CGG	ATG	AGC	CTG	GAC	AAG	GCC	870
K	C	R	G	Q	Q	D	I	K	H	R	M	S	L	D	K	A	284
CTG	CAG	AGA	GAG	CGG	ATA	TTC	TTC	GAG	GAT	CAC	GCA	CAT	TTC	AGG	GAC	CTT	921
L	Q	R	E	R	I	F	F	E	D	H	A	H	F	R	D	L	301
CTG	GAG	GAA	GGG	AAG	GCC	ACT	ATC	CCC	TGC	CTG	GCA	GAA	AGA	CTG	ACC	AGT	972
L	E	E	G	K	A	T	I	P	C	L	A	E	R	L	T	S	318
GAA	CTC	ATC	ATG	CAC	ATT	TGT	AAA	ACT	CTG	CCC	CTG	TTG	GAA	AAT	CAA	ATA	1023
E	L	I	M	H	I	C	K	T	L	P	L	L	E	N	Q	I	335
AAG	GAG	ACT	CAC	CAG	AGA	ATA	ACA	GAG	GAG	TTA	CAG	AAG	TAT	GGC	AAG	GAC	1074
K	E	T	H	Q	R	I	T	E	E	L	Q	K	Y	G	K	D	352
ATC	CCA	GAA	GAA	GAA	AGC	GAG	AAA	ATG	TTC	TGT	CTG	ATA	GAG	AAA	ATT	GAT	1125
I	P	E	E	E	S	E	K	M	F	C	L	I	E	K	I	D	369

ACA	TTT	AAT	AAA	GAG	ATC	ATC	TCA	ACA	ATA	GAA	GGG	GAG	GAA	TTC	GTG	GAG	1176
T	F	N	K	E	I	I	S	T	I	E	G	E	E	F	V	E	386
CAG	TAT	GAC	TCC	CGA	CTG	TTT	ACC	AAA	GTA	CGA	GCC	GAG	TTC	TCC	AAA	TGG	1227
Q	Y	D	S	R	L	F	T	K	V	R	A	E	F	S	K	W	403
AGC	GCT	GTG	GTT	GAG	AAA	AAT	TTC	GAA	AAA	GGT	TAT	GAA	GCC	ATA	CGT	AAA	1278
S	A	V	V	E	K	N	F	E	K	G	Y	E	A	I	R	K	420
GAA	ATC	AAG	CAA	TTT	GAA	AAT	CGG	TAT	CGT	GGC	AGA	GAG	TTG	CCA	GGG	TTT	1329
E	I	K	Q	F	E	N	R	Y	R	G	R	E	L	P	G	F	437
GTG	AAT	TAC	AAG	ACG	TTT	GAG	ACC	ATC	ATA	AAA	AAG	CAG	GTC	AGA	GTT	CTG	1380
V	N	Y	K	T	F	E	T	I	I	K	K	Q	V	R	V	L	454
GAA	GAG	CCT	GCT	GTG	GAC	ATG	CTG	CAC	ACG	GTG	ACA	GAT	ATA	ATC	CGG	AAT	1431
E	E	P	A	V	D	M	L	H	T	V	T	D	I	I	R	N	471
ACC	TTC	ACA	GAT	GTT	TCA	GGA	AAA	CAC	TTT	AAT	GAA	TTT	TTC	AAC	CTC	CAC	1482
T	F	T	D	V	S	G	K	H	F	N	E	F	F	N	L	H	488
CGA	ACT	GCC	AAG	TCC	AAA	ATT	GAA	GAC	ATT	CGA	TTA	GAA	CAA	GAA	AAT	GAA	1533
R	T	A	K	S	K	I	E	D	I	R	L	E	Q	E	N	E	505
GCT	GAG	AAG	TCC	ATC	CGA	CTA	CAT	TTC	CAA	ATG	GAG	CAG	TTG	GTC	TAC	TGC	1584
A	E	K	S	I	R	L	H	F	Q	M	E	Q	L	V	Y	C	522
CAG	GAC	CAG	GTG	TAC	CGG	CGT	GCA	TTG	CAA	CAG	GTC	AGA	GAG	AAG	GAG	GCA	1635
Q	D	Q	V	Y	R	R	A	L	Q	Q	V	R	E	K	E	A	539
GAA	GAA	GAA	AAG	AAC	AAA	AAA	TCA	AAC	CAT	TAC	TTC	CAA	TCC	CAG	GTC	TCA	1686
E	E	E	K	N	K	K	S	N	H	Y	F	Q	S	Q	V	S	556
GAG	CCC	TCC	ACA	GAT	GAG	ATC	TTT	CAA	CAC	CTG	ACC	GCG	TAC	CAG	CAG	GAA	1737
E	P	S	T	D	E	I	F	Q	H	L	T	A	Y	Q	Q	E	573
GTC	AGC	ACC	CGC	ATC	TCC	GGC	CAC	ATC	CCC	TTG	ATC	ATC	CAG	TTC	TTC	GTG	1788
V	S	T	R	I	S	G	H	I	P	L	I	I	Q	F	F	V	590
CTC	CGG	ACG	TAT	GGC	GAG	CAG	CTC	AAG	AAG	AGC	ATG	CTG	CAG	CTG	CTC	CAG	1839
L	R	T	Y	G	E	Q	L	K	K	S	M	L	Q	L	L	Q	607
GAC	AAG	GAC	CAG	TAC	GAC	TGG	CTG	CTG	AAG	GAG	CGC	ACC	GAC	ACC	AGA	GAC	1890
D	K	D	Q	Y	D	W	L	L	K	E	R	T	D	T	R	D	624
AAG	AGG	AAG	TTC	CTG	AAG	GAG	CGG	CTG	GAG	CGG	CTG	ACC	CGC	GCT	CGG	CAG	1941
K	R	K	F	L	K	E	R	L	E	R	L	T	R	A	R	Q	641
CGG	CTG	GCC	AAG	TTC	CCG	GGC	TGA	A									1966
R	L	A	K	F	P	G	*										649

Fig 23 : Séquence de l'insert BoMX1. Le cDNA a été obtenu à partir de cellules MDBK stimulées à l'IFN α . Les codons ATG et Stop sont en bleu. Les parties en italiques représentent les parties de séquence correspondant aux UTRs (*Untranslated regions*) du gène BoMX1. La séquence protéique est rigoureusement identique à la séquence de référence (U88329). En rouge, la substitution nucléotidique (T→C) en position 1212 de la séquence CDS.

III.1.4. EXPRESSION TRANSITOIRE DE BOMX1 EN CELLULES VERO

Avant d'entamer la sélection des clones stables, nous avons vérifié la fonctionnalité des mécanismes de transcription et de traduction. De plus, une expression transitoire a également permis de mesurer la capacité antivirale de BoMX1 par cytométrie en flux. Des cellules MDBK stimulées ou non (témoins positifs et négatifs) à l'interféron sont incluses dans le protocole expérimental. La présence de la protéine BoMX1 est révélée par immunofluorescence. Au niveau des cellules MDBK stimulées, cette révélation est positive ; elle est négative sur les cellules non stimulées, confirmant la validité de la technique effectuée à l'aide des anticorps anti-MXA humaine pour la détection de BoMX1.

Un marquage cytoplasmique typique délimite, par contraste, un noyau indemne de la protéine native (MDBK) ou recombinante (VERO).

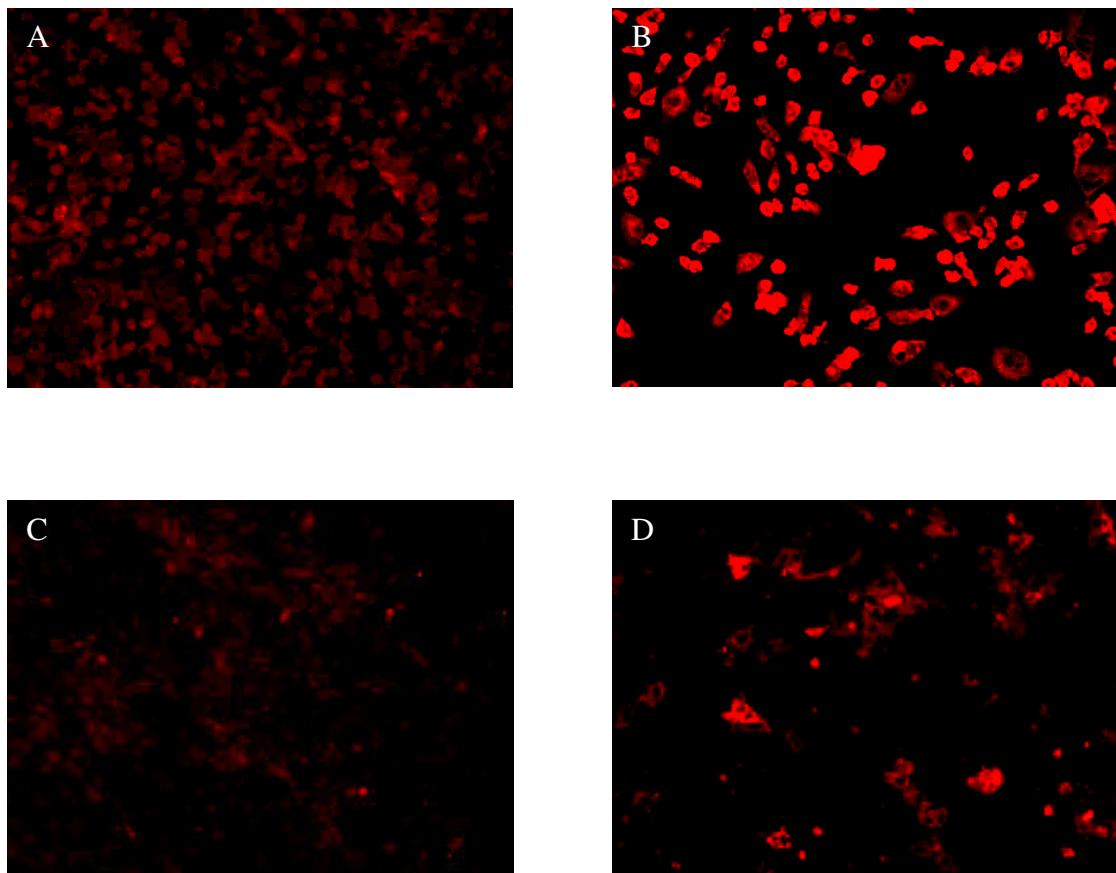


Fig 24 : Expression transitoire de BoMX1. A gauche : cellules MDBK non stimulées (A) et cellules Vero transfectées par le pcDNA4 (C). A droite : cellules MDBK stimulées par l'interféron (B) et cellules Vero transfectées par le pcDNA4-BoMx1 (D).

III.1.5. ETABLISSEMENT D'UNE LIGNEE VERO-PCDNA6 TRANSGENIQUE

Des cellules Vero transfectées à la lipofectamine 2000 à l'aide de 5 µg du vecteur pcDNA6 sont placées en plaque 6 puits pendant 2 jours dans un milieu de culture non sélectif. Après 48 h, la blasticidine est ajoutée au milieu et la mortalité cellulaire atteint 90% après deux semaines. A ce moment, des foyers de multiplication cellulaire apparaissent. Au terme de cinq semaines de sélection, nous avons obtenu une population polyclonale que nous avons nommée Vero-pcDNA6.

III.1.6. EXPRESSION STABLE DE BOMX1 EN CELLULES VERO-PCDNA6

Après avoir validé la construction pcDNA4-BoMX1 par la mise en évidence de l'expression transitoire de la protéine d'intérêt, nous pouvons mettre en œuvre le protocole destiné à établir des clones stables et inductibles. Cet objectif atteint, nous disposerions d'un outil particulièrement efficace pour la mesure de l'effet antiviral de BoMX1.

ETABLISSEMENT D'UNE POPULATION POLYCLONALE STABLE

Les vecteurs pcDNA4 et pcDNA4-BoMX1 sont restreints par *ScaI*. Les vecteurs linéarisés sont introduits en cellules Vero-pcDNA6 par électroporation. La sélection est effectuée par l'ajout de zéocine (300 µg/ml) tout en maintenant de la blasticidine (10 µg/ml) dans le milieu de culture. Au cours de la première semaine, une mortalité importante est constatée ; puis, elle se stabilise. Après 4 semaines, nous évaluons le taux d'expression BoMX1 en présence de doxycycline à environ 40%. Un processus de clonage est alors mis en place.

CLONAGE DE VEROPCDNA6/PCDNA4-BOMX1

La concentration en cellules de la suspension utilisée pour le clonage est de $2 \cdot 10^6$ cellules/ml. Dix µl de cette suspension sont dilués dans 10 ml de milieu (suspension II). Un volume égal d'un milieu enrichi en cytokines est ajouté et 192

puits sont ensemencés. Le processus fournit 45 clones dont deux (clones 27 et 33) présentent un taux d'expression de 60% et 80% respectivement, 24 h après stimulation à la doxycycline ; parallèlement, aucune expression n'est détectée en absence de l'inducteur. Après 40 h, la situation est identique ; 136 h après induction, le niveau d'expression des clones positifs est devenu très faible.

SOUS-CLONAGE DE VEROPCDNA6/PCDNA4-BOMX1

Cette étape réalisée sur 192 puits à partir des clones 27 et 33, fournit 144 clones. Le criblage par immunofluorescence nous permet d'en sélectionner 4 (76b, 99b, 103b et 117b).

Le taux d'expression reste inférieur à 100% (de l'ordre de 70%). La possibilité d'avoir sélectionné des populations oligo-clonales est envisagée mais les clonages successifs n'améliorent pas la situation. De plus, après quelques passages, l'extinction complète et rapide des clones est systématique. Cette disparition rapide de l'expression nous incite à émettre une hypothèse : l'expression sous le contrôle du promoteur CMV est instable. En d'autres termes, un contrôle épigénétique serait à l'origine de l'extinction rapide des clones productifs. Cette idée est renforcée par la présence d'ilôts CpG au niveau du promoteur CMV, ilôts qui constituent précisément une cible du contrôle épigénétique via leur hyperméthylation.²⁴⁸ D'autre part, un lien a été établi entre la méthylation de l'ADN et la déacétylation des histones dans le mécanisme de "gene-silencing" chez les eucaryotes.^{249,250}

RECOUVREMENT DE L'EXPRESSION DE BOMX1

Le principe de notre expérience de recouvrement de l'expression repose sur l'utilisation de deux substances capable d'interférer avec la méthylation de l'ADN et avec les histones déacétylases. Ces substances sont respectivement la 5'-azacytidine (5'-aza), un inhibiteur des méthyltransférases ADN spécifiques et la trichostatine A (TSA), un inhibiteur des histones déacétylases. Avant de réaliser cet essai, nous avons réalisé une étude de la toxicité de ces substances sur les cellules Vero-pcDNA6.

Test de toxicité à la TSA

La viabilité des cellules en culture (80% de confluence) a été déterminée pour une gamme de concentration en TSA s'étalant de 0 nM à 150 nM. La mortalité cellulaire est de 100% pour la concentration de 150 nM. Par contre, à la concentration de 40 nM, les cellules se multiplient selon une cinétique identique à celle des témoins ; de plus, l'examen microscopique révèle un aspect normal des cellules, sans aucun signe cytopathogénique (Tableau 8). Cette concentration sera celle utilisée pour le test de recouvrement de l'expression.

Tableau 8. Test de toxicité à la TSA

TSA (nm)	150	140	130	120	110	100	90	80	70	60	50	40	30	20
Effets	†	†	†	†	†	‡	‡	‡	‡	‡	‡	∅	∅	∅

† Mortalité importante

‡ Multiplication cellulaire perturbée (toujours légère mortalité)

∅ Pas d'effet significatif visible

Test de toxicité à la 5-AZA

Pour ce test, la viabilité des cellules a été déterminée pour des concentrations en 5-AZA s'échelonnant de 10 à 150 µM. La mortalité est importante dès la concentration de 50 µM. Une multiplication cellulaire légèrement altérée est encore enregistrée pour la concentration de 25 µM. A 10 µM, la culture présente un comportement identique à celui des cellules témoins. (Tableau 9).

Tableau 9. Test de toxicité à la 5-AZA.

5-AZA (µM)	10	25	37,5	50	62,5	75	87,5	100	112,5	125	137,5	150
Effets	∅	‡	‡	†	†	†	†	†	†	†	†	†

† Mortalité importante

‡ Multiplication cellulaire perturbée (toujours légère mortalité)

∅ Pas d'effet significatif visible

Activation de la transcription par la 5-AZA et la TSA

Les clones 76b, 99b, 103b et 117b simplement stimulés à la doxycycline présentent un taux d'expression de 30 à 40 % constant pour la période couverte par l'expérience (1 à 6 jours). L'ajout de 5-AZA ne permet pas d'obtenir une réactivation satisfaisante des différents clones. Tout au plus, une légère augmentation du niveau d'expression est-elle observée. Il en va tout autrement avec la TSA puisque pour l'ensemble des clones, le taux d'expression se situe entre 90 et 100%. La combinaison 5-AZA + TSA génère un résultat comparable à celui obtenu avec la TSA seule, confirmant ainsi l'observation. L'analyse du taux d'expression en fonction du temps d'exposition à la TSA indique qu'un contact de 24 heures permet d'atteindre l'effet maximal. Les différents clones répondent d'une façon similaire à l'induction. Cependant, le clone 103b (dénommé V103), sur base de son taux d'expression pratiquement égal à 100%, a été sélectionné pour les tests de résistance à l'infection virale.

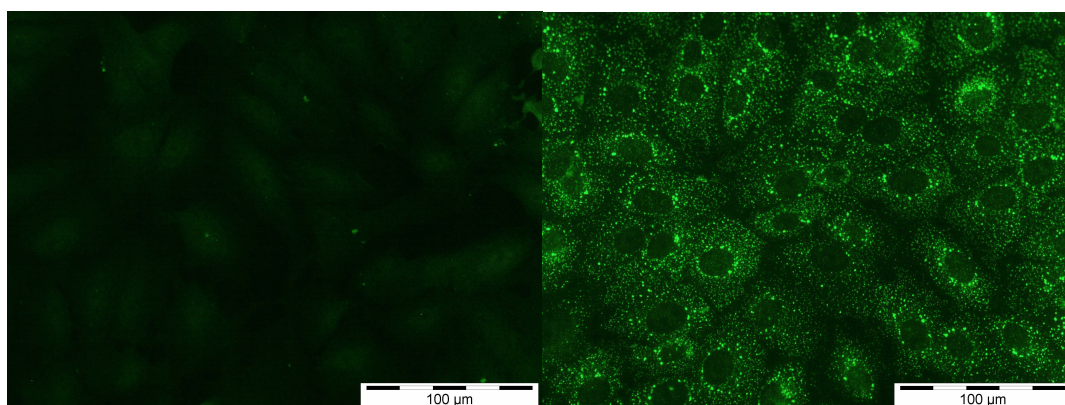


Fig. 24 : Expression inductible de BoMX1 par le clone V103. Expression de BoMX1, visualisée par immunofluorescence, par le clone VeropcDNA6-pcDNA4-BoMX1-103b (V103) sans induction (A) et après induction (B) pendant 24 h à la doxycycline. Les cellules tant en A qu'en B ont été traitées pendant 24 h à la TSA (40 nM).

III.1.7. IDENTIFICATION PAR WESTERN BLOT ET IMMUNOMARQUAGE

L'identité de la protéine exprimée en cellules V103 est confirmée par comparaison avec le pattern obtenu pour des cellules MDBK stimulées ou non par l'IFN α . La concentration en protéines des différents extraits est déterminée par la méthode au BCA. Les échantillons normalisés (10 μ g/puits) sont analysés par Western

blot. L'immunomarquage sur membrane révèle la présence d'une bande de 75 kDa environ répondant à l'induction par la doxycycline (V103) ou par l'IFN- α (Fig : 25 et 25 bis).

III.1.8. TEST CINÉTIQUE DE L'EXPRESSION DE BOMX1

Les cellules V103 (clone103b) présentent les caractéristiques recherchées, à savoir une expression inductible forte et homogène. Cependant, avant de tester la fonctionnalité de l'activité antivirale de BoMX1, il est indispensable de déterminer le temps de persistance de la protéine dans les cultures induites. En effet, une extinction rapide de l'expression, en rendant aux virus infectants l'environnement cytoplasmique de la cellule Vero naïve, ferait perdre aux tests leur pertinence.

La première étude cinétique de l'expression est réalisée par immunofluorescence. Une plaque de 24 puits estensemencée à l'aide de cellules V103b à raison de 15000 cellules/puits dans le milieu de culture contenant de la TSA (20 nM). Après 4 jours, le milieu est remplacé par un milieu contenant la doxycycline (1 μ g/ml) supplémenté en TSA (20 nM) seule ou de TSA (20 nM) et de 5-AZA (10 μ M). Après 24 heures, le milieu est remplacé par le DMEM plus 2% de FCS. Les cellules de la colonne 1 (jour 1) sont fixées par le PAF (4%) immédiatement tandis que celles de la colonne 2 (jour 2) le sont le lendemain. Le processus se répète jusqu'au jour 6. L'analyse par immunofluorescence révèle que l'expression est maintenue à 100% pendant au moins quarante-huit heures. On observe ensuite une légère diminution progressive. Le maintien de l'expression est donc suffisamment persistant pour permettre une interaction éventuelle avec plusieurs cycles de réplication des virus étudiés. La présence de 5-AZA n'a visiblement aucune influence sur le maintien de BoMX1.

Une analyse en cytométrie en flux permet de suivre la cinétique de l'expression de la protéine BoMX1 en cellules V103 après une induction à la doxycycline pendant 24 h. Celle-ci étant éliminée, la fluorescence des cellules est enregistrée après 1, 24, 48 et 72 h. L'analyse montre que l'expression est déjà induite après 1 h et qu'elle atteint son maximum après 24 h. Elle se maintient à ce niveau pendant 48 h. La concentration en BoMX1 chute alors rapidement puisqu'elle revient à son niveau de base après 72 h

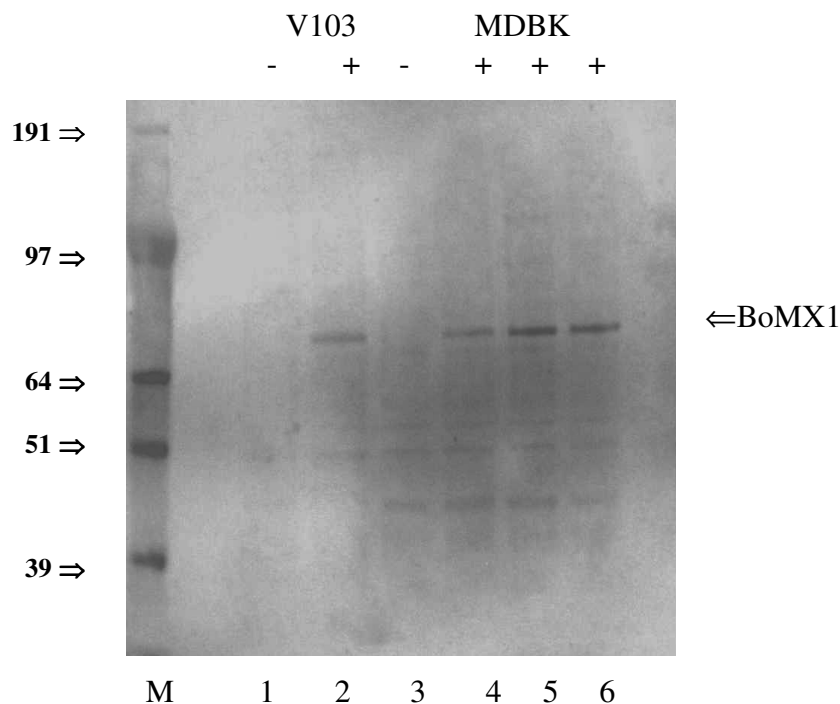


Fig. 25 : Immunomarquage après Western blot des extraits de cellules V103 (1 et 2) et de cellules MDBK (3, 4, 5 et 6). Les cellules V103 stimulées à la doxycycline (2) et les cellules MDBK stimulées par l' IFN α aux doses de 100 U (4), 10.000 U (5), et 100.000 U (6), sont caractérisées par une bande de 75 kDA ; cette bande est absente dans le cas des cellules V103 (1) et MDBK (3) non stimulées. Les échantillons normalisés (10 μ g de protéines totales) ont été chargés sur gel dénaturant et après électrophorèse transféré sur membrane PVDF. Les anticorps de lapin anti-HuMXA ayant réagi avec BoMX1 ont été détectés par un anticorps secondaire marqué à la biotine et révélés par la streptavidine couplée à la HRP à l'aide du substrat 3-amino-9-éthylcarbazole (AEC). M : marqueurs de masse moléculaire.

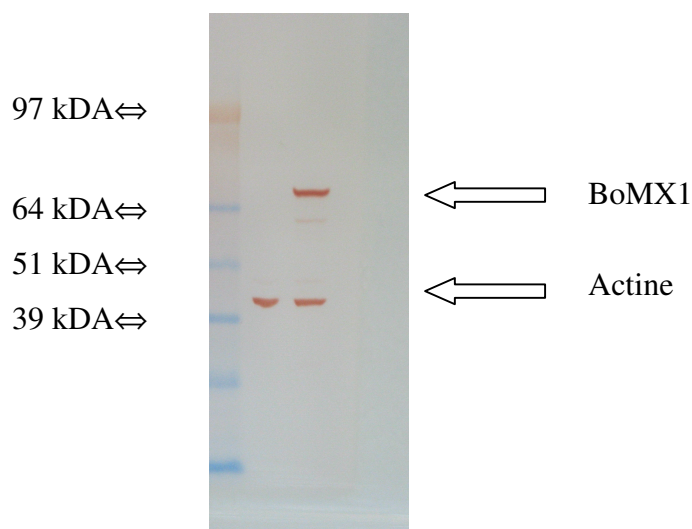


Fig. 25bis : Spécificité de l'induction des cellules V103. L'immunomarquage de cellules V103 stimulées (+) et non stimulées (-) par les anticorps anti-BoMX1 et anti-actine confirme la régulation stricte de l'expression de BoMX1. M : marqueurs de masse moléculaire.

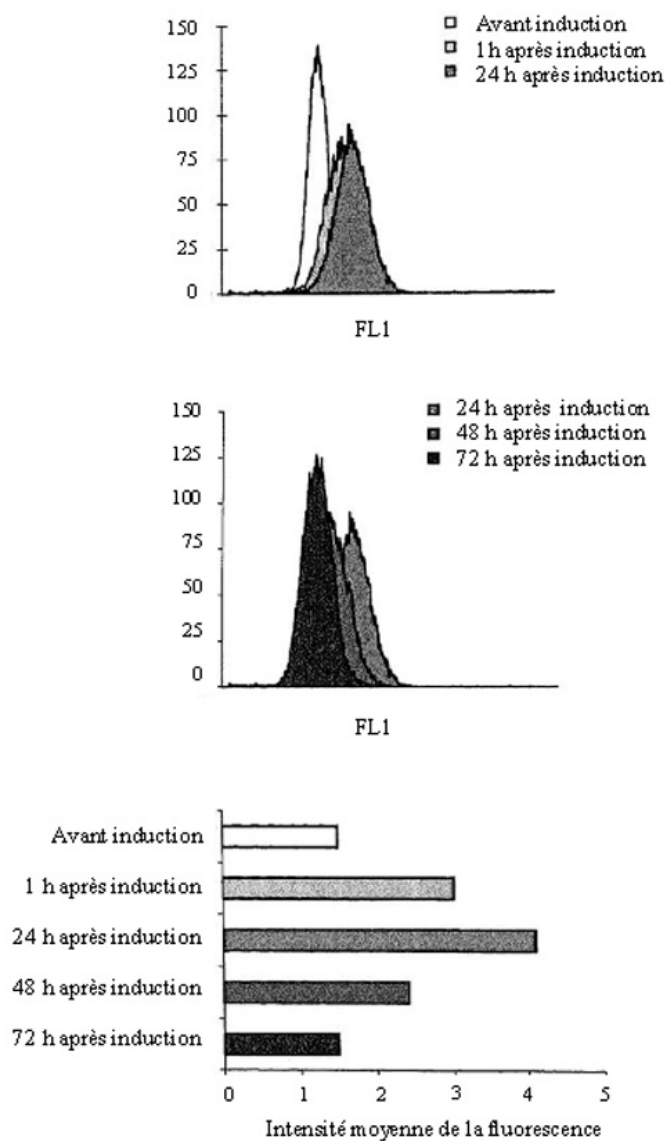


Fig. 26 : Analyse par cytométrie en flux de l'expression de BoMX1. Les cellules induites ou non induites (témoins) à la doxycycline (1 $\mu\text{g/ml}$) pendant 24 h sont analysées 1 h, 24 h, 48h et 72 h après transfert des cellules dans un milieu de culture sans inducteur. L'anticorps primaire polyclonal de lapin anti-HuMXA est marqué par l'anticorps secondaire couplé au fluorophore alexa 488 ; le nombre de cellules analysées en FL1 (Cytomètre Cytomics™ FC-500 - Beckman Coulter Inc. , CA) est de 10000.

B. Evolution de la fluorescence moyenne. La fluorescence moyenne des populations de cellules marquées comme indiqué en A est enregistrée aux différents temps après induction.

III.1.9. ABSENCE D'UN EFFET CYTOTOXIQUE DE LA PROTEINE BOMX1

Pour déterminer l'absence de cytotoxicité cellulaire liée à l'expression de BoMX1, les cellules V103, induites et non induites, sont soumises au test MTS. Pour rappel, ce test mesure la capacité des cellules en culture de réduire le MTS par l'intermédiaire des équivalents réducteurs produits par le métabolisme cellulaire. Ce dernier dépend évidemment du nombre de cellules viables présentes et de leur niveau métabolique. Le suivi de l'absorbance de cultures cellulaires stimulées (n=6) et non stimulées (n=6) pendant 96 h montre un profil identique (Fig. 27).

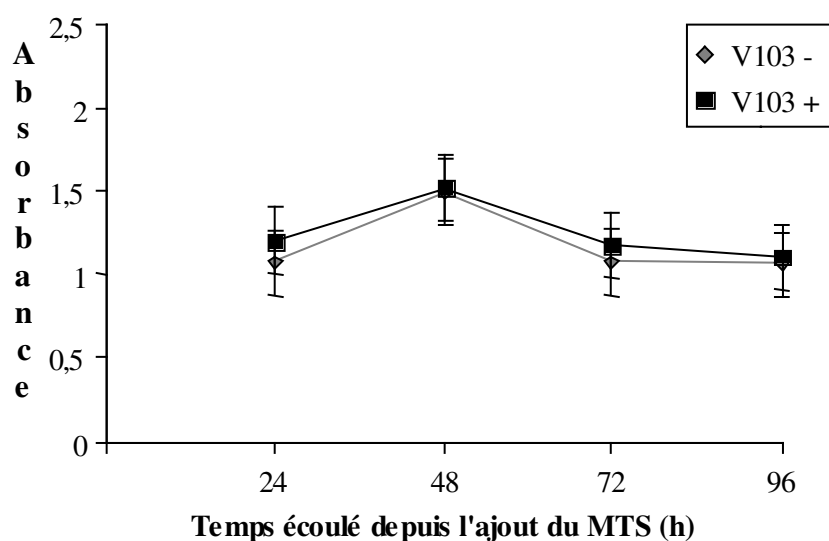


Fig. 27 : Absence de cytotoxicité de BoMX1 par le test MTS. L'activité métabolique des cellules V103 stimulées (V103+) ou non (V103-) évolue parallèlement au cours du temps. Les valeurs moyennes d'absorbance (\pm SD) enregistrées à 495 nm, ont été obtenues à partir de six expériences indépendantes.

III.2. FONCTION ANTIVIRALE DE BOMX1 VIS-À-VIS D'UN *VESICULOVIRUS*

III.2.1. INTRODUCTION

L'objectif de cette étude est de vérifier la fonctionnalité de la BoMX1 vis à vis d'un virus type dont la caractéristique principale est d'être sensible aux protéines MX de différentes espèces. Naturellement, notre choix s'est porté sur le VSV, virus de la stomatite vésiculeuse (*Rhabdoviridae*, genre *Vesiculovirus*), inhibé par les protéines MX2 (cytoplasmiques) murines, huMXa (humaine), les MX1 et MX2 de rat, la MX1 porcine... Il s'agit véritablement d'un virus modèle, capable d'infecter différentes espèces : caprine, ovine, bovine, équine, porcine et humaine. L'espèce comprend au moins 35 souches sérologiquement différenciées, dont deux sont particulièrement connues : les souches Indiana et New Jersey. Le virus est transmis par contact cutané ou par la voie des muqueuses. Egalement détecté chez les insectes, il est pourtant souvent considéré comme un virus d'origine végétale. Les anticorps spécifiques de la réponse humorale sont incapables de prévenir l'infection.

Sa réplication est strictement cytoplasmique. Son génome d'environ 15 kB est constitué d'un seul brin d'ARN monocaténaire de polarité négative qui code pour 5 protéines principales : glycoprotéine (G), protéine matricielle (M), nucléoprotéine, protéine "large" (L) et la phosphoprotéine. Ces deux dernières protéines sont impliquées dans la réplication de l'ARN; la protéine G est responsable de l'attachement du virus à la membrane de la cellule hôte et de la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'endosome après endocytose.

III.2.2. INHIBITION DE LA REPLICATION DU VSV

Cette inhibition est mise en évidence à l'aide des tests "virus plaque assay" et "virus yield reduction assay".

« VIRUS PLAQUE ASSAY »

Des monocouches de cellules V103, stimulées ou non à la doxycycline pendant 24h (plaques 24 puits ; 80000 cellules/puits) sont infectées à l'aide de dilutions

identiques du virus VSV souche Indiana (titre du stock : $10^{8.6}$). Après incubation à 37°C pendant 1 h, les puits sont recouverts d'un milieu de culture (DMEM, FCS Tet free 2%) contenant 0.6% d'agar. Après 48 h, la croûte d'agar est enlevée et les effets cytopathogènes visualisés après coloration des cellules au cristal violet. L'effet antiviral de l'expression de BoMX1 apparaît clairement dès la dilution 10^6 et est confirmée pour les dilutions 10^7 et 10^8 (Fig. 28). Un résultat similaire est obtenu lors d'une expérience mettant en œuvre la souche New Jersey.

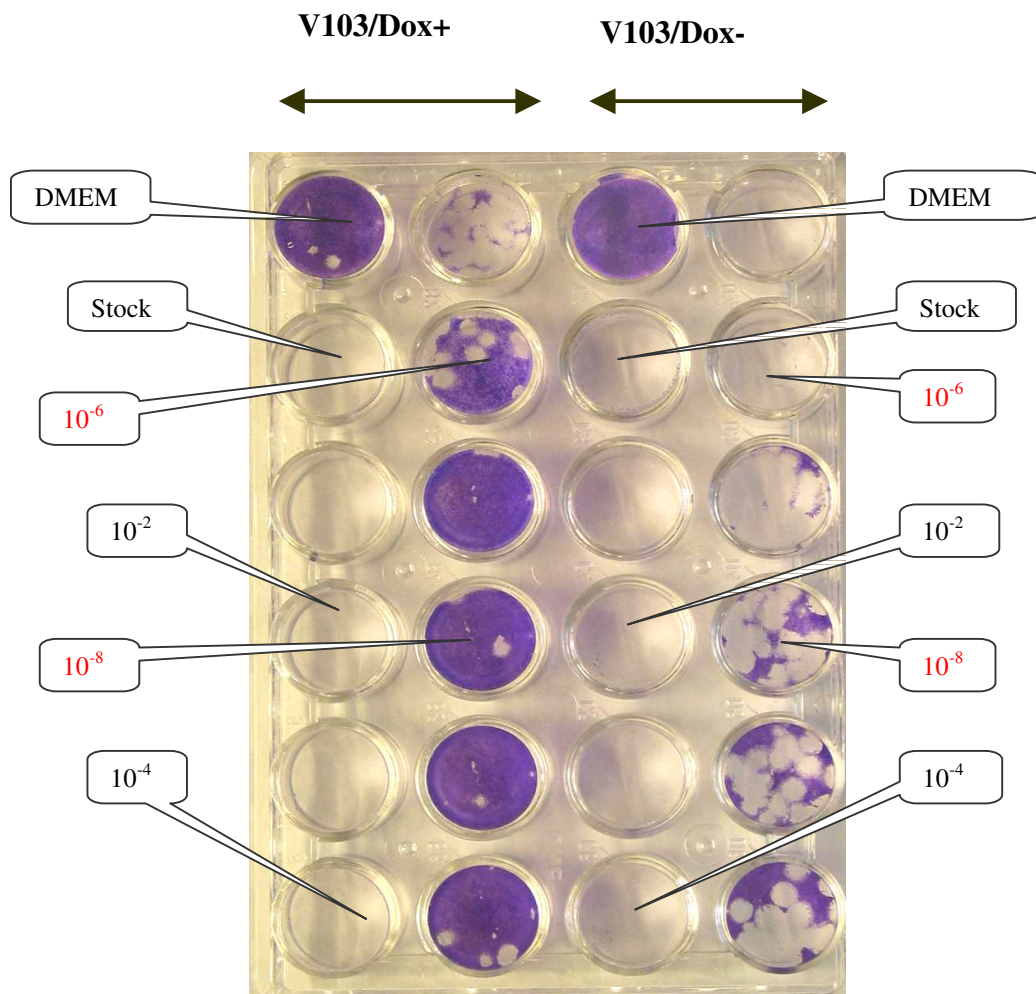


Fig.28 : Activité lytique de VSV (souche INDIANA) et BoMX1. Les cellules exprimant BoMX1 (Dox+) résistent à l'activité lytique du VSV dès la dilution 10^6 . A la dilution 10^8 , les effets cytopathogènes ont pratiquement disparu. A ces dilutions, les cellules non induites (Dox-) présentent de larges plages de lyse. Les cellules ont été inoculées à l'aide de dilutions du virus s'étendant depuis la dilution 0 (stock) jusqu'à la dilution 10^{10} . Après une exposition au virus de 48 h, la croûte d'agar est enlevée et les puits sont colorés au cristal violet. Les surfaces bleu foncé identifient les cellules protégées par l'expression de BoMX1.

"VIRUS YIELD REDUCTION ASSAY"

Une culture de cellules V103 induites et une culture de cellules non induites sont infectées par un virus VSV appartenant au sérotype Indiana ou New Jersey. L'expérience est réalisée en triplicat et ce pour deux multiplicités d'infection (0.1 et 1). Les surnageants de culture sont prélevés 22 h après l'infection et la titration en retour effectuée sur cellules Vero. Les dilutions s'étendent de 10^1 à 10^{10} . Les plaques sont mises en culture et le dénombrement des puits infectés est réalisé après une incubation de 22 h. La TCID₅₀ est calculée par la méthode de Muench-Reed.²⁵¹

Le tableau 10 reprend les valeurs obtenues pour chaque test. Il apparaît clairement que la réplication du virus est contrariée par l'expression de BoMX1. En effet, à une MOI de 0.1, les TCID₅₀ sont inférieures de trois ordres de grandeur pour les cellules stimulées ; à une MOI de 1, la BoMX1 interfère toujours avec la réplication du VSV, le facteur de différence calculé entre les TCID₅₀ étant dans ce cas de 100. L'effet antiviral vis-à-vis des deux sérotypes mentionnés ci-dessus apparaît plus clairement encore sous forme graphique (Fig. 29).

Tableau 10 : Titration en retour des surnageants de cellules exprimant ou non la BoMX1 infectées par le VSV souche Indiana à deux MOI.

	MOI 0.1		MOI 1	
	BoMX1+	BoMX1-	BoMX1+	BoMX1-
TCID ₅₀ (Test1)	10^{-4}	10^{-7}	$10^{-4.16}$	10^{-7}
TCID ₅₀ (Test2)	$10^{-4.16}$	$10^{-6.48}$	$10^{-4.8}$	$10^{-6.8}$
TCID ₅₀ (Test3)	$10^{-3.77}$	$10^{-6.48}$	$10^{-4.3}$	$10^{-6.48}$
MOYENNE	$4,13 \cdot 10^{-04}$	$5,54 \cdot 10^{-07}$	$4,5 \cdot 10^{-05}$	$4,97 \cdot 10^{-07}$

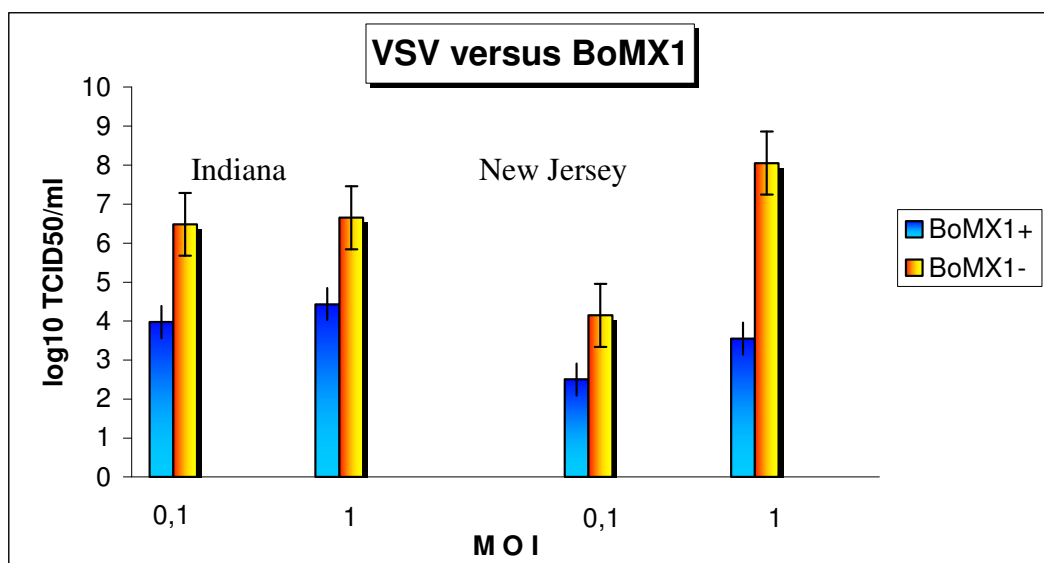


Figure 29 : Inhibition de la multiplication du virus VSV par BoMX1. Les cellules V103 induites (barres bleues) ou non (barres rouge et jaune), infectées par le sérotype Indiana (partie droite du graphique) ou New Jersey (partie gauche) du VSV pendant 22 h aux MOI 0,1 et 1. Les valeurs moyennes de TCID₅₀ présentées ici sont obtenues à partir de 3 expériences indépendantes. Barre = déviation standard.

III.3. FONCTION ANTIVIRALE DE BOMX1 VIS-À-VIS D'UN *RESPIROVIRUS*, LE BOPI3

III.3.1. INTRODUCTION

Le virus bovin *parainfluenza* de type 3 appartient à la famille des *Paramyxoviridae*, genre *Respirovirus*. Son génome est constitué d'ARN non segmenté de polarité négative, sa transcription génère des ARNm individualisés. Le cycle de réplication est strictement cytoplasmique. La pénétration du virus dans la cellule dépend de l'activité d'une glycoprotéine de surface, la protéine F, qui réalise la fusion des membranes virale et cytoplasmique. Sa présence au sein des troupeaux de bovidés est commune. Elle est associée habituellement à une infection légère ne présentant pas de signes cliniques. Par contre, son rôle en tant qu'initiateur de maladies respiratoires sévères est reconnu et peut conduire au développement de pneumonie bactérienne secondaire. Le virus *parainfluenza* de type 3 bovin est sensible aux IFN- α/β , propriété qu'il partage avec son *alter ego* humain.²⁵² Le mécanisme de cette inhibition n'est pas connu.

III.3.2. PROTECTION ANTIVIRALE PAR L'EXPRESSION DE BOMX1

TITRATION DIRECTE

La titration directe ("virus plaque assay") est réalisée afin d'estimer la protection potentiellement conférée par BoMX1 aux cellules V103 exprimant la BoMX1. Les cellules stimulées ou non sont infectées par des dilutions sériées (de 10 en 10) à partir du stock du virus BoPI3. De façon inattendue, les plages de lyse sont observées dans les deux conditions expérimentales jusqu'à la dilution de 10^{-6} (Fig. 30).

IMMUNOFLUORESCENCE

Un double marquage est réalisé à l'aide des anticorps polyclonaux de lapin anti-HuMXA et de bovin anti-BoPI3 sur des cellules stimulées et infectées à une MOI

de 0.5 pendant 16 h. Le marquage secondaire est réalisé par des anticorps couplés aux fluorophores Alexa 488/568. L'examen en épifluorescence montre que les protéines virales sont largement présentes au sein de la population BoMX1 positive (Fig. 31).

TEST MTS

L'infection de cellules par le virus affecte la viabilité cellulaire. Celle-ci est mesurée par le test MTS dans une expérience mettant en jeu des cellules V103 exprimant ou non la BoMX1. Le test de cytotoxicité est mené sur une période s'étendant du deuxième au neuvième jour après l'infection. Différentes MOI (de 10^{-1} à 10^{-4}) sont incorporées dans ce test. Le profil des courbes représentant l'évolution métabolique des cellules se révèle rigoureusement parallèle. (Fig.32).

CYTOMETRIE EN FLUX

L'analyse est réalisée 15 h après infection des cellules à une MOI de 0.5. Les cellules stimulées ou non, sont phénotypées après marquage du virus à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine M. La proportion de cellules viro-positives au sein d'une population de 10.000 cellules est très proche dans les deux conditions : 66.5% (V103+) et 68.4% (V103-). La différence enregistrée n'est pas significative ainsi que le montre l'analyse statistique ($p > 0.05$) par le test du χ_i^2 (Fig. 33). L'analyse de la fluorescence moyenne confirme ce résultat. Réalisée entre 11 h et 15 h après l'infection à l'aide d'un anticorps monoclonal et un anticorps polyclonal dirigé contre la protéine M, elle est en augmentation constante ; l'intensité de fluorescence des deux populations se révèle ici encore identique (Fig. 34).

TITRATION INDIRECTE

Les dilutions de virus BoPI3 ont été adsorbées sur des cellules V103 induites ou non pendant 60 minutes aux MOI de 1, 10^{-1} et 10^{-2} . Les cultures sous croûte d'agar sont maintenues à 37°C pendant 5 jours. Quatre expériences indépendantes ont fourni les données pour l'établissement des valeurs et des graphiques de titration des surnageants BoMX+ et BoMX- (Fig. 35). Les valeurs de TCID₅₀ obtenues ne permettent pas d'attribuer à BoMX1 un effet inhibiteur de la réplication de BoPI3.

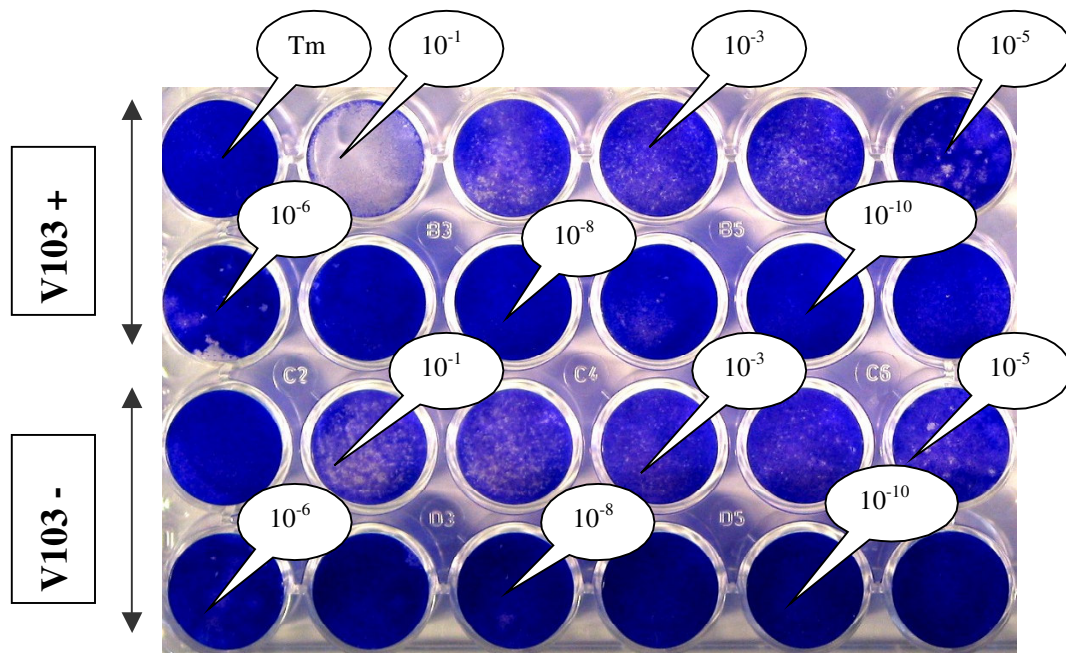


Fig. 30 : Absence de protection vis-à-vis des effets cytopathogènes générés par BoPI3. Les cellules sont infectées par des dilutions sériées de 10 en 10 pendant 1 h. Après 9 jours d'incubation sous croûte d'agar, les cellules sont colorées au cristal violet. Les plages de lyse sont détectées pour les puits stimulés (V103+) et non stimulés (V103-) jusqu'à la dilution 10^{-6} .

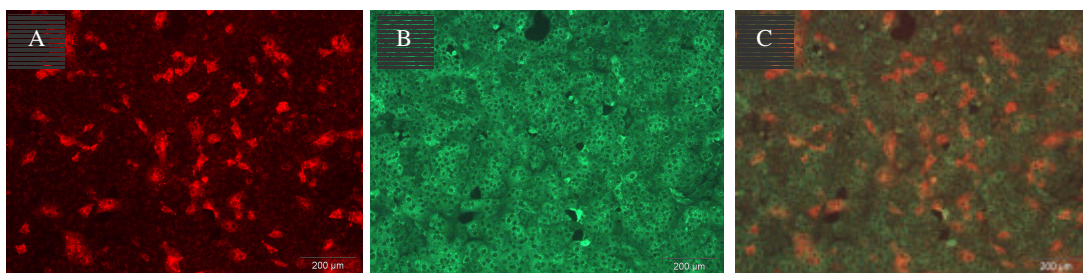


Fig. 31 : Immunofluorescence double de la protéine BoMX1 et du virus BoPI3. Les cellules stimulées V103 sont infectées (MOI 0.5) pendant 16 h et marquées par les anticorps anti-BoPI3 (A) et anti-MXA (B). Le virus se réplique au sein de la population BoMX1 ainsi que le montre la somme des images (C).

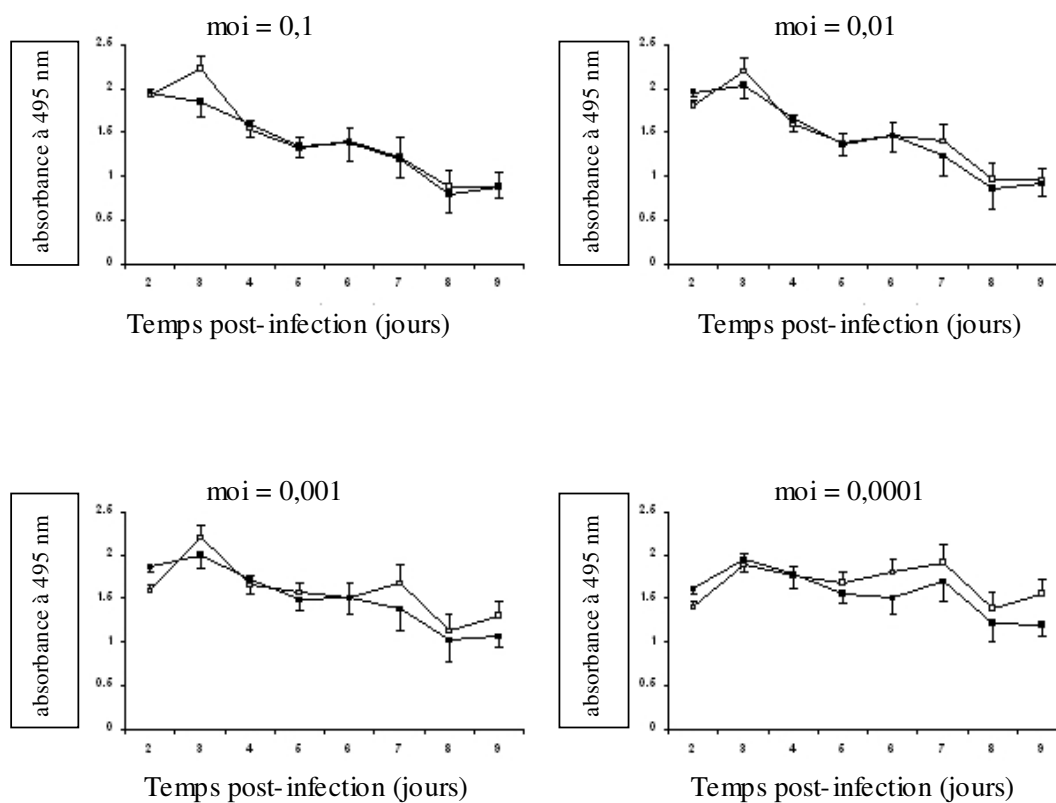


Fig. 32 : Test de viabilité cellulaire (MTS) sur cellules V103 infectées par le BoPI3. L'activité métabolique est suivie du deuxième au neuvième jour après l'infection. Les valeurs présentées correspondent à la moyenne ($n=6$) \pm SD des absorbances mesurées à 495 nm (référence 650 nm).
 ■ BoMX- ; □ BoMX+

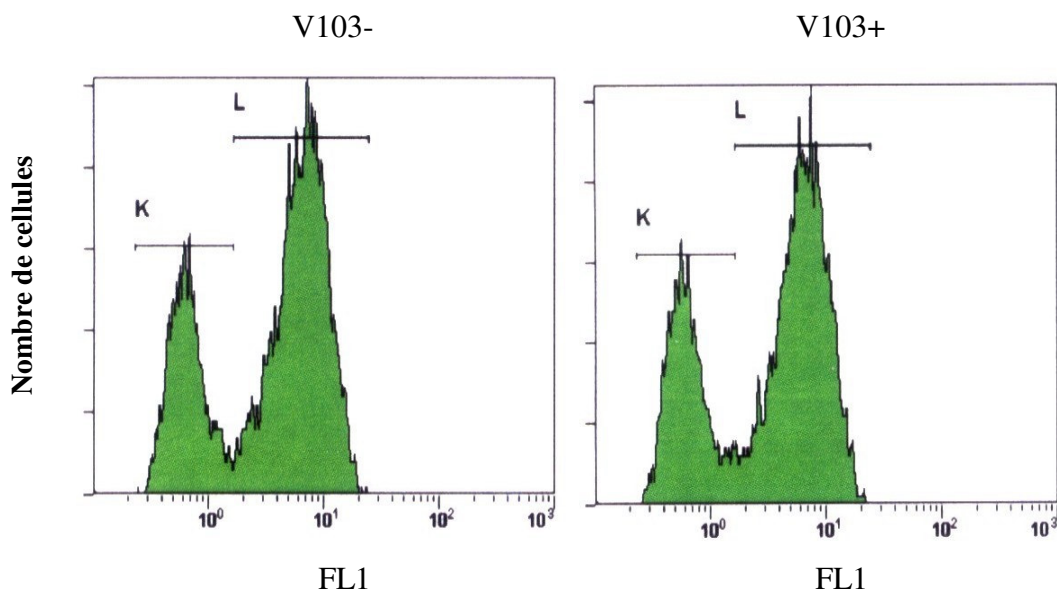


Fig. 33 : Expression de BoMX1 et nombre de cellules infectées. La proportion de cellules viro-positives (courbe sous segment L) est de 68.4% pour les V103- et de 66.5% pour les V103+. Les cellules sont infectées à une MOI de 0,5 et fixées 15 h après infection, avant d’être marquées à l’aide d’un anticorps spécifique anti-BoPI3 et d’un anticorps secondaire couplé à l’Alexa 488. La fluorescence des cellules est analysée en FL1.

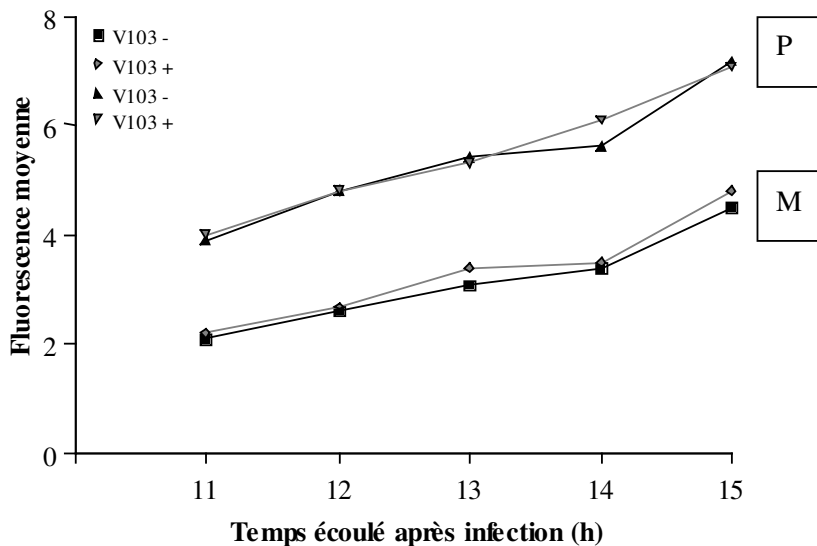


Fig. 34 : Evolution de la fluorescence moyenne. Les cellules sont marquées par deux anticorps dirigés contre la protéine M de BoPI3 (le premier - P - polyclonal ; le second - M - monoclonal). Après marquage par un anticorps secondaire couplé à l’Alexa 488, l’intensité de fluorescence moyenne de la population positive (10.000 cellules) est mesurée en cytométrie en flux. L’évolution des courbes des cellules induites exprimant BoMX+ (V103+) ou ne l’exprimant pas (V103-) est strictement parallèle et les valeurs de fluorescence identiques.

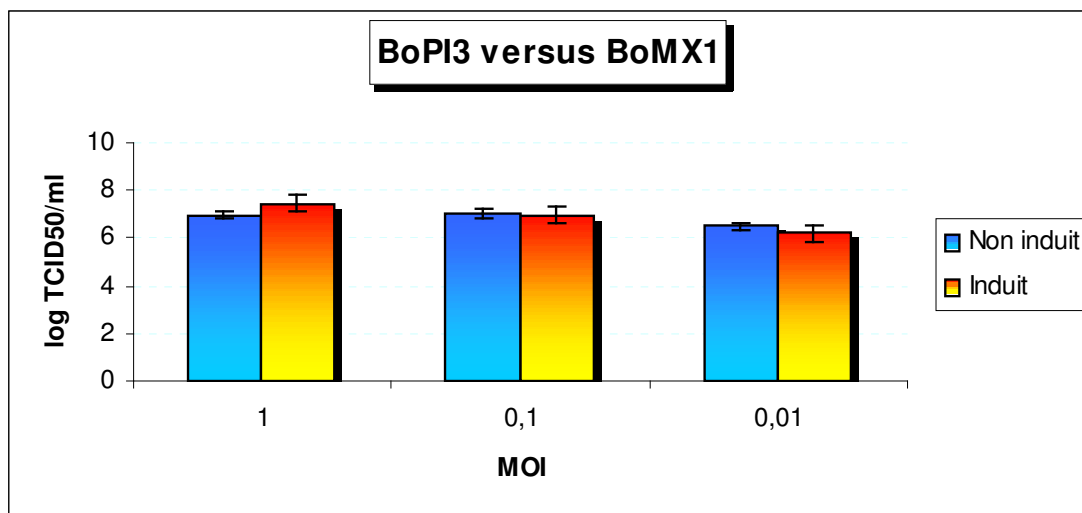


Fig. 35 : Etude de l'inhibition, induite par BoMX1, de la réplication de BoPI3 par un test de titration indirecte. Les surnageants de cellules V103 non induites (rectangles bleus) ou induites (rectangles rouge et jaune) infectées aux MOI de 1, 10^{-1} et 10^{-2} sont titrés sur cellules Vero naïves. Après 5 jours d'incubation, le calcul de la TCID₅₀/ml ne permet pas de mettre en évidence un effet inhibiteur sur la réplication du virus.

III.4. FONCTION ANTIVIRALE DE BOMX1 VIS À VIS D'UN *PNEUMOVIRUS*, LE BORSV

III.4.1. INTRODUCTION

Le virus respiratoire syncytial bovin (BoRSV) appartient à la famille des *Paramyxoviridae*, et plus précisément au genre *Pneumovirus*. Son génome est constitué d'un seul fragment d'ARN de polarité négative. Le génome est transcrit en ARNm codant pour une ou plusieurs des dix protéines constituant le "protéome viral". Le virus pénètre la cellule par fusion avec la membrane plasmique cellulaire. Les trois protéines virales de surface - G, protéine d'attachement, F, protéine de fusion et SH, dont le rôle exact reste inconnu - sont associées au mécanisme de pénétration cellulaire. Toutefois, il a été démontré récemment que les deux dernières citées ne seraient pas indispensables à la réplication virale.^{253, 254} Précisons ici que celle-ci est exclusivement cytoplasmique.

D'un point de vue médical, le BoRSV est un pathogène respiratoire important chez la bête bovine. Les pertes économiques qui lui sont imputables ne sont pas négligeables.

III.4.2. PROTECTION ANTIVIRALE PAR L'EXPRESSION DE BOMX1

TITRATION DIRECTE

L'expérience est réalisée sur les cellules V103 induites ou non, infectées par les dilutions sériées du virus BoRSV. Les plaques 24 puits sont mises en culture pendant 9 jours sous croûte d'agar. Les plages de lyse sont détectées jusqu'à la dilution 10^{-3} qu'il y ait ou non expression de la protéine BoMX1 (Fig. 36).

TEST MTS

La viabilité cellulaire est suivie du deuxième au neuvième jour après infection. Une relation apparaît clairement entre la dose virale et l'importance des effets cytotoxiques tels que mesurés par le test MTS. Toutefois, quelle que soit la MOI, les

deux courbes de viabilité cellulaire, avec ou sans BoMX1 produite, présentent des profils parallèles (Fig. 37).

IMMUNOFLUORESCENCE

L'immunofluorescence double du virus BoRSV et de BoMX1 sur cellules V103 stimulées ou non, infectées à une MOI de 0.1 pendant 38 h, montre que le virus se reproduit de façon similaire dans les deux conditions expérimentales (Fig. 38). Cette analyse qualitative résultant de l'examen des lamelles en épifluorescence se doit d'être confirmée par une analyse quantitative. La cytométrie en flux est réalisée à cette fin sur des cellules infectées à une MOI de 0.3, stimulées ou non et marquées après 38 h (Fig. 39). Le phénotypage des cellules (10.000 cellules) génère les données suivantes : 35,6% (V103-) de cellules infectées contre 36.3% (V103+). Cette différence enregistrée de 0.7% n'est pas significative ($p > 0.05$; test du Chi-carré).

TITRATION INDIRECTE

Le succès de la multiplication virale est évalué par la titration des particules infectieuses produites par la lignée inductible, infectée à différentes MOI. Après 4 jours, le surnageant des cellules, stimulées ou non, est titré sur cellules MDBK. Ici encore, l'absence d'un effet protecteur est constaté (Fig. 40).

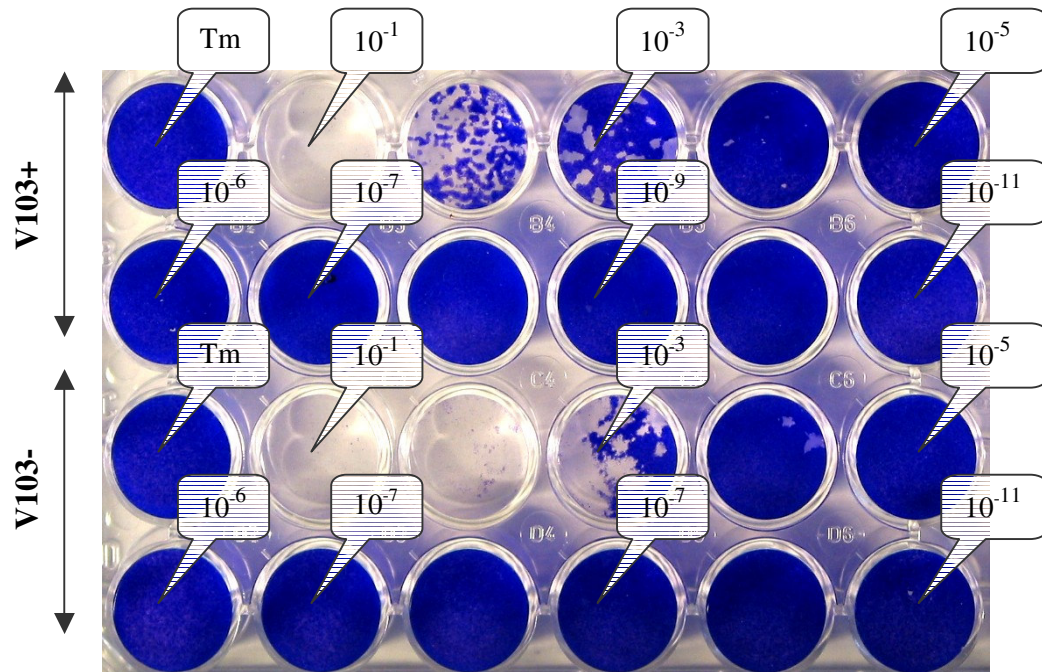


Fig.36 : Absence de protection vis-à-vis des effets cytopathogènes générés par le BoRSV. Après stimulation (V103+) ou non (V103-), les cellules sont infectées par des dilutions sériées (10 en 10) du virus pendant 1 h. Recouvertes d'une croûte d'agar, elles sont incubées pendant 9 jours avant d'être colorées au cristal violet. L'activité lytique de BoRSV disparaît complètement à partir de la dilution 10^{-4} tant chez les cellules V103- que V103+. Tm= témoin (non infecté). Les dilutions sont indiquées à l'intérieur des bulles).

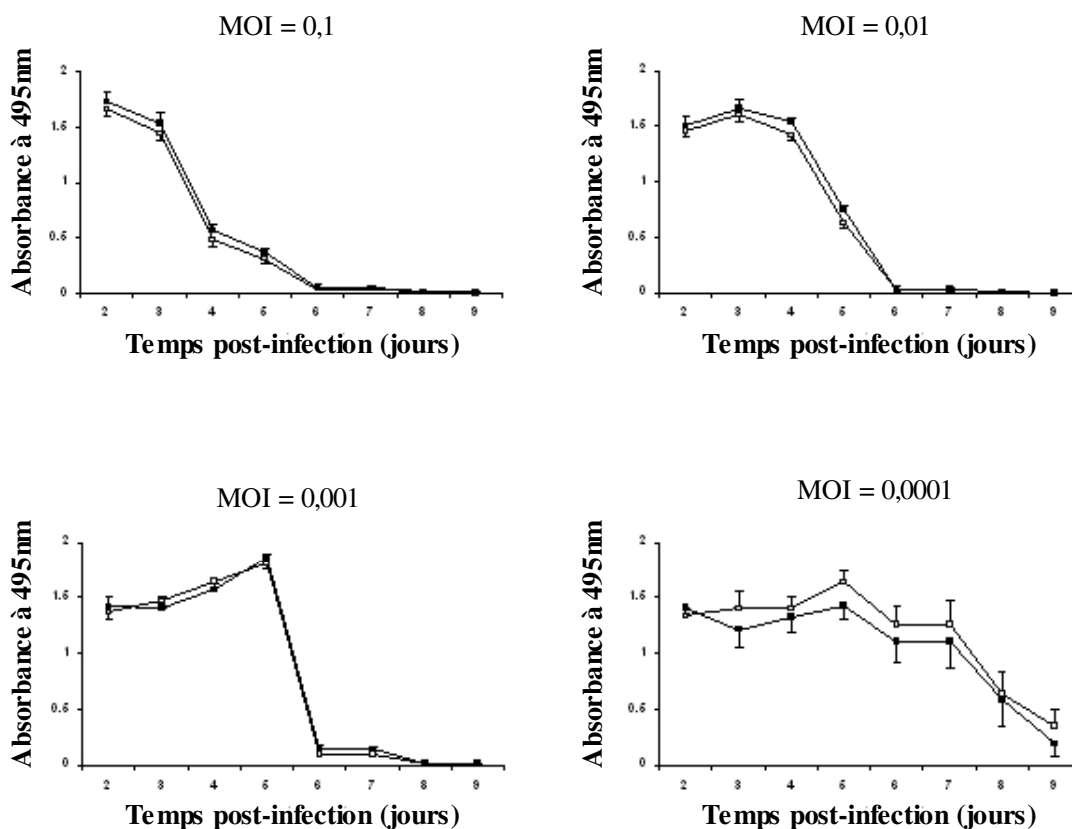


Fig. 37 : Test de viabilité cellulaire (MTS) sur cellules V103 infectées par le BoRSV. L'activité métabolique est suivie du deuxième au neuvième jour après l'infection. Les valeurs présentées correspondent à la moyenne ($n=6$) \pm SD des absorbances mesurées à 495 nm (référence 650 nm). ■ BoMX- ; □ BoMX+

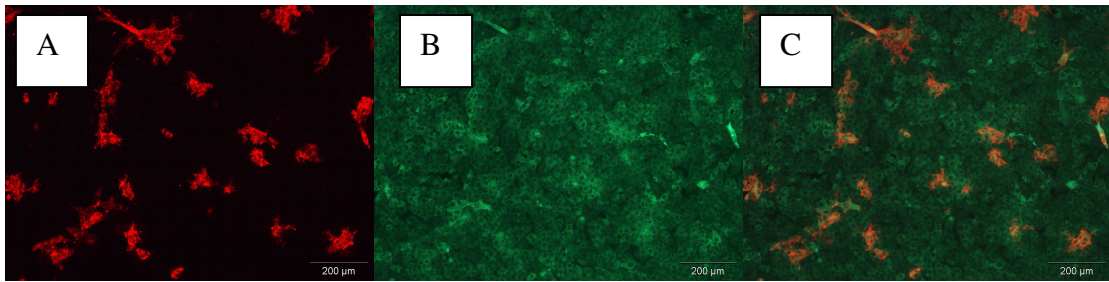


Fig. 38 : Immunofluorescence double de la protéine BoMX1 et du virus BoRSV. Les cellules stimulées V103 sont infectées (MOI 0.1) pendant 38 h et marquées par les anticorps anti-BoPI3 (A) et anti-MXA (B). Le virus se réplique au sein de la population BoMX1 ainsi que le montre la somme des images (C).

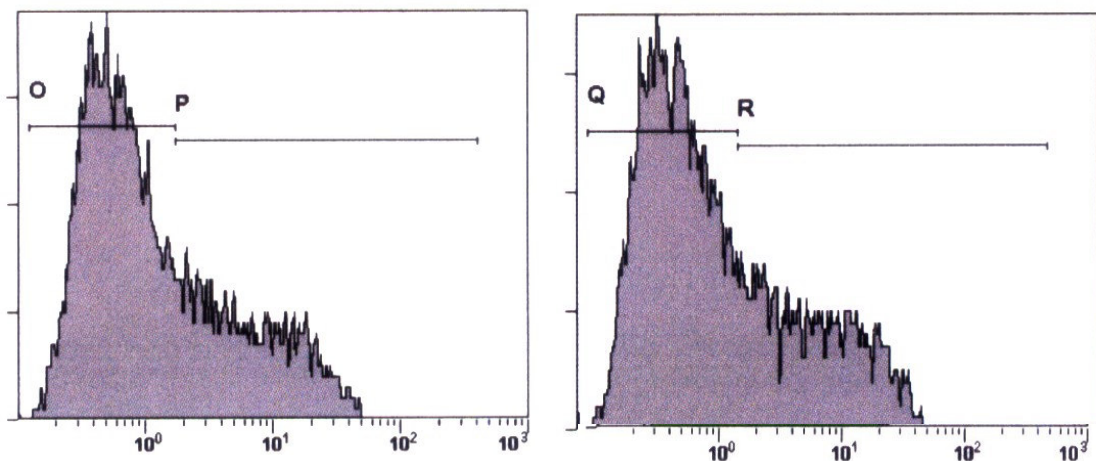


Fig. 39 : L'expression de BoMX1 ne modifie pas le nombre de cellules infectées. La proportion de cellules viro-positives (courbe sous segment P) est de 35,6.% pour les V103- et de 36,3 % pour les V103+ (courbe sous segment R). Les cellules sont infectées à une MOI de 0,3 et fixées 38 h après infection, avant d'être marquées à l'aide d'un anticorps spécifique anti-BoPI3 et d'un anticorps secondaire couplé à l'alex 488. Nombre de cellules analysées : 10.000. La fluorescence des cellules est analysée en FL1. Les segments O et Q sont obtenus par l'analyse d'une population cellulaire non infectée.

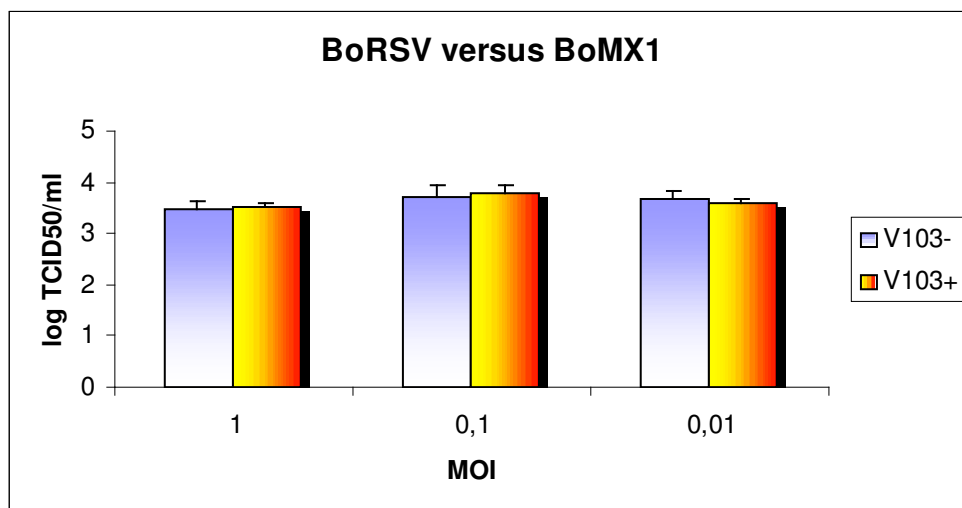


Fig. 40 : Etude de l'inhibition, induite par BoMX1, de la réplication de BoRSV par un test de titration indirecte. Les surnageants de cellules V103 non induites (rectangles bleu) ou induites (rectangles rouge et jaune) infectées aux MOI de 1, 10^{-1} et 10^{-2} sont titrés, 4 jours après l'infection, sur cellules MDBK. Le calcul de la $TCID_{50}/ml$ ne permet pas d'attribuer à BoMX1 un effet inhibiteur sur la réplication du virus. Les moyennes (\pm SD) sont calculées à partir de 3 expériences indépendantes.

III.5. ACTIVITÉ ANTIVIRALE DE BOMX1 VIS-À-VIS D'UN *ORTHOMYXOVIRUS*, L'INFLUENZA A.

III.5.1. INTRODUCTION

La famille des *Orthomyxoviridae* appartient ainsi que les virus décrits ci-dessus au groupe V qui concentre les virus enveloppés à ARN monocaténaire et de polarité négative. Elle comprend 5 genres : *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*, *Thogotovirus* et *Isavirus*.

L'espèce type du genre *Influenzavirus A* est l'Influenza A. Ses deux glycoprotéines de surface, l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA), peuvent être distinguées sur base de leurs propriétés antigéniques, caractéristiques qui sont à la base de la classification des différentes souches virales en fonction de la combinaison de leur sérotype. Actuellement, la classification internationale reprend 16 et 9 sérotypes respectivement pour l'hémagglutinine (H1-H16) et la neuraminidase (N1-N9) dont les combinaisons génèrent un nombre théorique de 125 sous-types pour l'espèce Influenza A.

Le génome est constitué de 8 fragments d'ARN (HA, NA, PA, PB1, PB2, NP, NS, et M) codant pour 10 protéines (HA, NA, PA, PB1, PB2, NP, NS1, NS2, M1 et M2) auxquelles il convient d'ajouter une nouvelle protéine (PB1-F2) identifiée chez certaines espèces hôtes.^{255,256}

L'évolution du virus procède de deux mécanismes distincts. Le premier (antigenic drift) correspond à l'accumulation de mutations ponctuelles se manifestant au niveau de la séquence protéique ; le second (antigenic shift) est en fait un réassortiment des gènes entre deux souches virales infectant concomitamment une espèce hôte permissive. Ce processus est à la base des craintes générées par l'épizootie engendrée par la souche hypervirulente H5N1 d'origine aviaire mais dont un possible réassortiment avec une souche humaine pourrait conduire à une pandémie. Du point de vue de la réplication, le virus Influenza A se fixe à la cellule via l'acide sialique et y pénètre par endocytose. Son cycle comprend une phase nucléaire.

III.5.2. CINÉTIQUE D'EXPRESSION DU VIRUS

INFLUENZA A H1N1 EN CELLULES VERO

Avant d'étudier les effets de BoMX1 sur la réplication du virus Influenza A, la cinétique de l'infection de cellules Vero a été visualisée pour la souche Influenza A H1N1 de porc utilisée dans notre laboratoire. L'immunofluorescence a été réalisée à l'aide d'un anticorps anti-NP (dirigé contre la Nucléoprotéine virale) monoclonal révélé à l'aide d'un anticorps conjugué à l'alexa 567. La fixation est réalisée toutes les 2 heures. La chute de l'intensité de fluorescence nucléaire et l'augmentation du nombre de cellules infectées enregistrées entre la sixième et la huitième heure indique la transition entre deux cycles. L'augmentation de la seule intensité après 10 h confirme l'entrée dans un second cycle (Fig. 41).

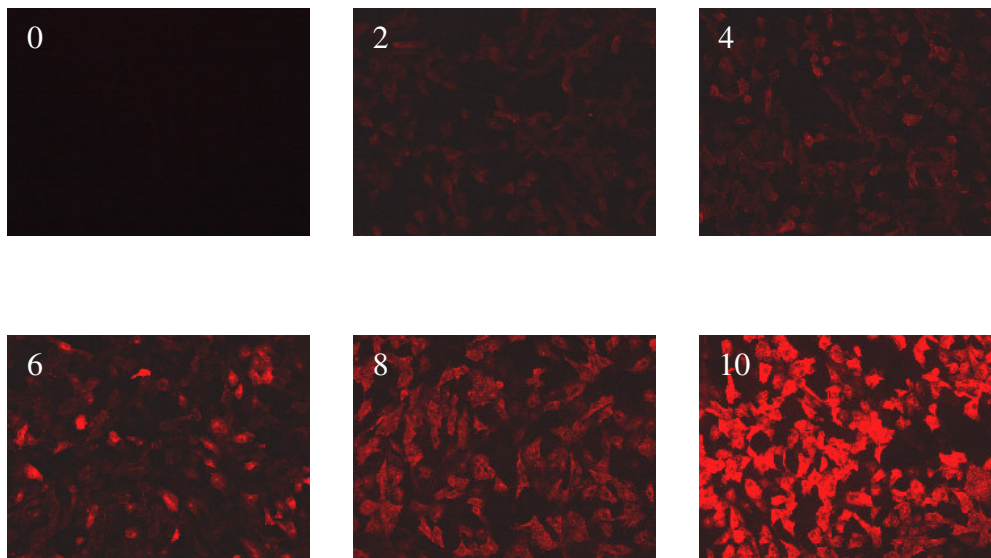


Fig. 41 : Cinétique d'infection de cellules Vero par le virus Influenza A H1N1. Les cellules ont été fixées toutes les 2 h depuis $t = 0$ h jusqu'à $t = 10$ h. La protéine NP a été marquée à l'aide d'un anticorps monoclonal. La transition entre les deux cycles apparaît clairement entre la sixième et la huitième heure.

III.5.3. PROTECTION ANTIVIRALE CONFEREE PAR L'EXPRESSION DE BOMX1

INHIBITION DU VIRUS INFLUENZA A H1N1 PAR L'EXPRESSION TRANSITOIRE DE BOMX1 EN CELLULES VERO

Pour réaliser ce test, nous avons transfecté à l'aide de lipofectamine des cellules Vero par le vecteur pcDNA4-BoMX1 et, afin d'établir un élément de comparaison, par le pcDNA4-huMXA. Après 12 heures d'incubation, les cellules transfectées sont infectées par le virus H1N1 et incubées pendant 7 heures. Après fixation, les cellules sont marquées à l'aide d'anticorps polyclonal anti-MXA et monoclonal anti-NP. Après un marquage secondaire fluorescent (anti-rabbit alexa 488 et anti-souris R-phycoérythrine), les cellules sont phénotypées par cytométrie en flux. L'expression de BoMX1 ou de HuMXA réduit de façon significative le taux d'expression des protéines virales (Tableau 13).

Tableau 13. Inhibition du virus Influenza A par l'expression transitoire de BoMX1 et HuMXA en cellules Vero

Expérience 1

MOI 0.1; BoMX1

	Population BoMX1-	Population BoMX1+
Total	8131	1869
Non infectées	4451	1716
Infectées	3680	153
Pourcentage d'infection	45.2% (I)	8.1% (II)

Différence entre les proportions infectées (I-II) = 37.1% [38.6-35.3]^A (CI 95%)

MOI 0.1 ; HuMXA

	Effectif HuMXA-	Effectif HuMXA+
Total	8871	1129
Non infectées	5605	881
Infectées	3266	248
Pourcentage d'infection	36.82% (I)	21.97% (II) ^a

Différence entre les proportions infectées (I-II) = 14.85% [12.15-17.38]^A (CI 95%)

Expérience 2

MOI 0.1 ; BoMX1

	Population BoMX1-	Population BoMX1+
Total	94396	527
Non infectées	52635	496
Infectées	41761	31
Pourcentage d'infection	44.1% (I)	5.88% (II')

Différence entre les proportions infectées (I-II') = 38.3% [40.1-35.8]^A (CI 95%)

MOI 0.1 ; HuMXA

	Effectif HuMXA-	Effectif HuMXA+
Total	8984	1016
Non infectées	6497	851
Infectées	2517	165
Pourcentage d'infection	28.02%	16.24%

Différence entre les proportions infectées (I-II) = 11.78% [9.2 - 14.11]^A (CI 95%)

A : Intervalle de confiance pour la différence entre les proportions selon Newcombe, Robert G²⁵⁷

TITRATION DIRECTE

Les cellules V103 stimulées ou non sont infectées à l'aide de dilutions sérieées du virus *Influenza A H1N1*. Le titre de l'ampoule initiale est estimé à $8,5 \cdot 10^6$ pfu/ml sur cellules MDBK. Pour l'infection, le milieu de culture a été remplacé par du DMEM (pas de FCS) en présence de TPCK ($2 \mu\text{g/ml}$). Après 4 jours d'incubation sous croûte d'agar, les puits sont révélés au cristal violet. L'analyse visuelle indique une protection par l'expression de la BoMX1 qui apparaît clairement dès la dilution 10 fois du virus (Fig. 42).

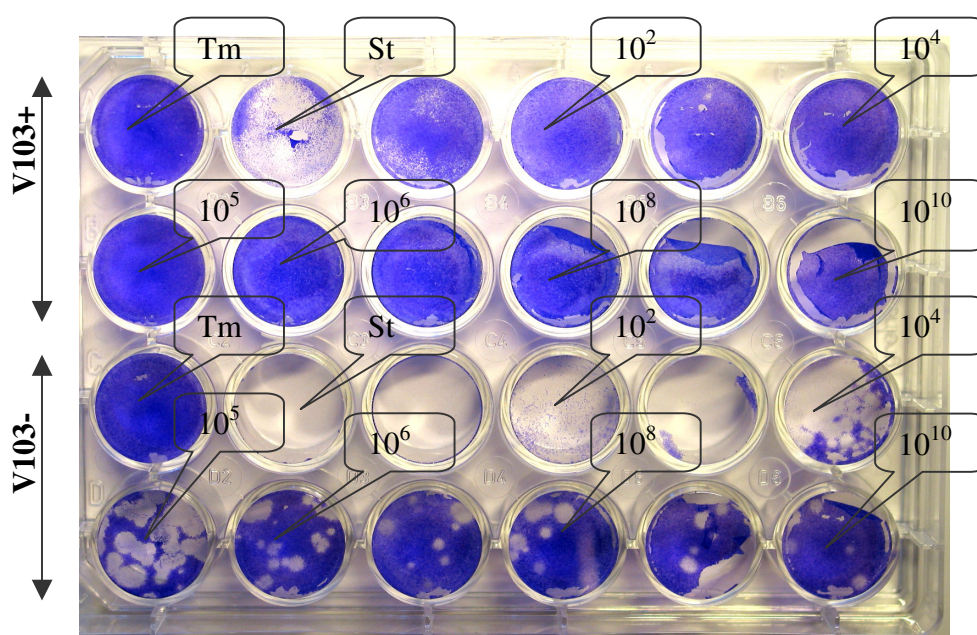


Fig. 42 : Expression de BoMX1 et inhibition du virus *Influenza A H1N1*. Les cellules V103 stimulées (V103+) ou non (V103-) sont infectées par le virus *Influenza A* aux dilutions indiquées. Dès la dilution 10^1 (titre du stock : $8,5 \cdot 10^6$ pfu/ml), la protection vis-à-vis des effets lytiques de H1N1 est évidente.

Tm : témoin non infecté ; St : virus du stock, non dilué.

IMMUNOFLUORESCENCE

L'étude de l'inhibition de la réplication du virus *Influenza A* par la technique d'immunofluorescence a été menée selon deux modes. Le premier, que nous appellerons mode "end-point" visualise le nombre de cellules infectées après plusieurs

cycles de réplication (24 h) pour des cellules exprimant ou non BoMX1. Le second, "cinétique", suit la réplication du virus au cours de son premier cycle, tant dans les cellules V103+ et V103-, par le truchement du marquage de la nucléoprotéine (NP) et de la BoMX1. Le nombre de cellules positives est largement inférieur chez les cellules stimulées après 24 h. La différence apparaît très tôt puisque dès le premier cycle elle est manifeste (Figs. 43 et 44).

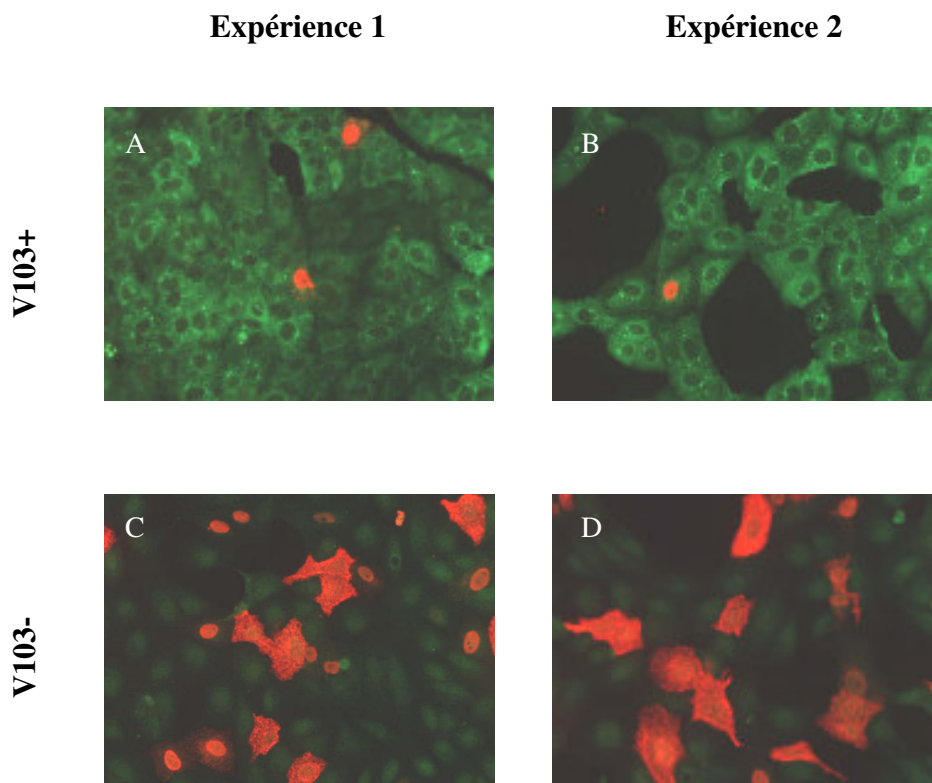


Fig 43 : Inhibition de la réplication du virus Influenza A par BoMX1. Les cellules V103 stimulées (A et B) ou non stimulées (C et D) sont analysées par immunofluorescence 24 h après infection (MOI : 0,1). Le double marquage - protéine virale (en rouge) ; protéine BoMX1 (en vert) - permet de visualiser une différence très marquée du taux d'infection sur l'ensemble des champs.

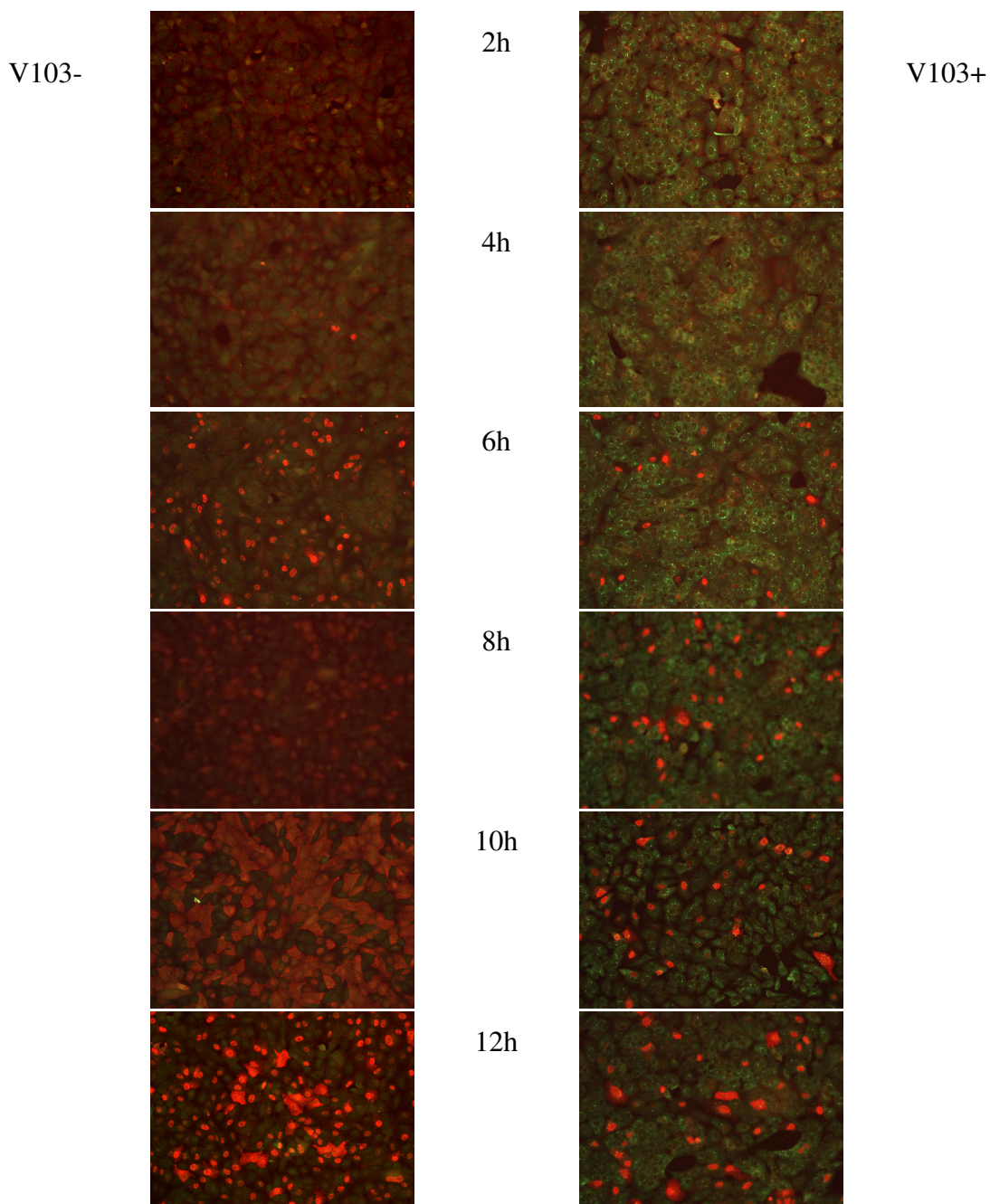


Fig. 44 : Aspects cinétiques de la réplication du virus *Influenza A H1N1* par BoMX1. Les cellules V103 non stimulées (colonne de gauche) et stimulées (colonne de droite) ont été infectées à une MOI de 0,3 et fixées selon l'horaire repris sur la figure. Un double marquage – BoMX1 en vert et NP virale en rouge – permet de suivre l'évolution de l'infection par immunofluorescence. Après 6 heures, le nombre de cellules stimulées infectées est nettement inférieur à celui des cellules non stimulées. La réplication intervient entre la sixième et la huitième heure pour les cellules non stimulées. Après 12 h, le nombre de cellules infectées est largement supérieur à celui des cellules stimulées. Pour ces dernières, il semble que le terme du premier cycle de réplication ne soit pas encore atteint.

TITRATION EN RETOUR

L'expérience de titration en retour a été menée sur le virus H7N7, un virus de virulence élevée (high pathogenicity). Techniquement, cela permet de travailler sans trypsine ; sur le plan fondamental, il est évidemment intéressant de vérifier le potentiel antiviral sur les souches *d'Influenza A* parmi les plus agressives. La souche virale H7N7 est amplifiée sur œufs embryonnés. Le titre du stock ainsi constitué est de $1.46 \cdot 10^9$. Les tests indépendants ont été réalisés trois fois. Les conditions expérimentales d'infection s'étendent sur une plage assez large. En effet, pas moins de 5 MOI ont été utilisées : 0.05 ; 0.10 ; 0.5 ; 1 et 10. La titration est effectuée 72 h après l'infection initiale. Dans ces conditions, une réduction de la TCID₅₀ est mesurée pour les cellules exprimant BoMX1 et ce, quelle que soit la multiplicité d'infection. Elle est maximale pour une MOI de 0.5. En effet, au-delà de cette valeur, le système est biaisé car la multiplication du virus H7N7 hypervirulent est réduite en raison de la mortalité importante au sein des cellules non stimulées (V103-). Par contre, pour les cellules stimulées, les valeurs de TCID₅₀ augmentent régulièrement en fonction de la concentration initiale en virus. De façon remarquable, à la MOI de 10, le titre obtenu pour les cellules V103+ reste inférieur à celui des cellules non stimulées infectées à une MOI de 0.05. A cette dernière valeur, la TCID₅₀ est nulle pour les cellules induites (V103+) ; elle est de 10^5 pour les cellules non induites. A une MOI de 0.5, les valeurs fournies par l'expérience deviennent $10^{0.63}$ et 10^9 respectivement (Fig. 45). Le degré de protection est donc ici supérieur à 10^8 .

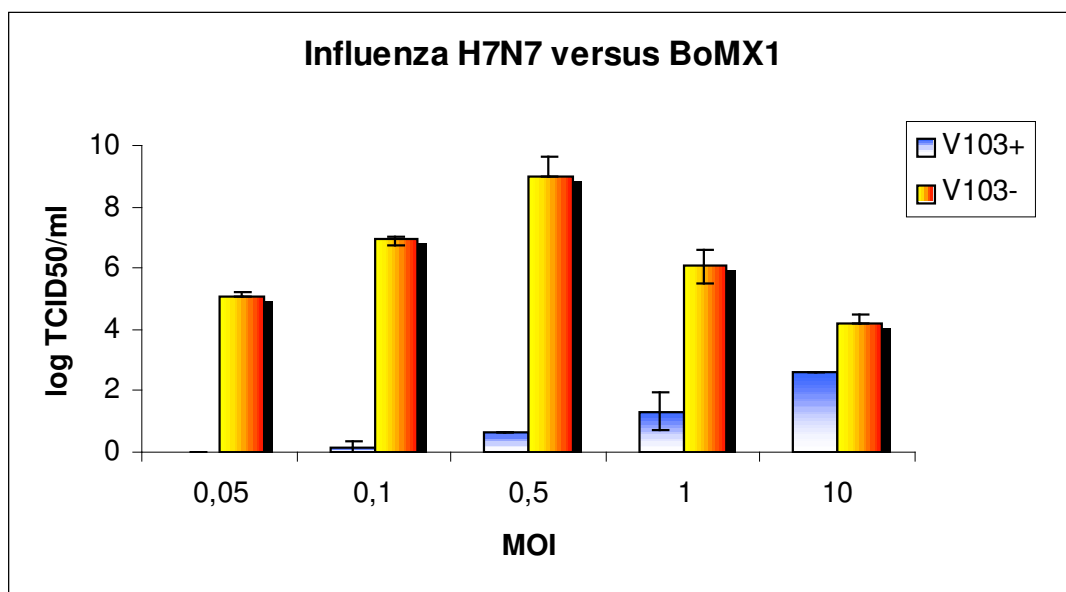


Fig. 45 : Titration indirecte. Inhibition du virus *Influenza A H7N7* par la BoMX1. Les surnageants de cellules V103 non induites (rectangles bleus) ou induites (rectangles rouge et jaune) infectées aux MOI indiquées, sont titrés, 72 h après l'infection, sur cellules Vero. Les plaques sont lues 48 h après le début de la titration. A la multiplicité d'infection de 0,05, le surnageant des cellules induites produit un titre nul. Ce titre augmente ensuite régulièrement mais reste inférieur à 3 (2,63 log TCID₅₀/ml pour une MOI = 10). Pour les cellules non induites, les titres enregistrés sont nettement plus élevés. Un maximum est atteint dès la MOI de 0,5.

III.6. ETUDE DE L'INHIBITION DE LA SYNTHÈSE D'ARN VIRAUX

III.6.1. INTRODUCTION

L'inhibition spectaculaire de la réplication du virus *Influenza A* par l'expression de BoMX1, nous venons de le montrer, est visualisable au niveau de la synthèse protéique dès les premières heures qui suivent l'infection. Naturellement, se pose la question du mécanisme qui sous-tend ce phénomène particulièrement efficace. Une première approche consiste à déterminer si l'action de la GTPase est détectable au niveau de la synthèse des acides ribonucléiques viraux.

III.6.2. RT-PCR SEMI-QUANTITATIVE

L'objectif de cette expérience est de mettre en évidence un effet de la BoMX1 sur la synthèse d'ARN par une approche semi-quantitative et cinétique. Pour ce dernier aspect, nous avons limité l'expérience au premier cycle de réplication.

Une RT-PCR a été dessinée en vue de l'amplification de deux ARNm de polarité positive codant pour les protéines M1 et M2. Rappelons que ces protéines sont les produits d'un splicing alternatif du gène M (segment 7). La taille des cDNAs résultants est de 294 pb (M2) et de 759 pb (M1).

Trois amorces sont mises en œuvre pour réaliser cette RT-PCR. La transcription inverse spécifique de l'ARN cible est assurée par l'utilisation de l'amorce M2 reverse. La deuxième (M1/M2 forward), s'étend en amont du site de splicing. Elle est associée au couple M2 reverse et M1 reverse qui garantit la spécificité des deux réactions PCR. Après mise au point des conditions de RT-PCR telles que décrites au chapitre "Matériel et Méthodes", l'extraction de l'ARN total de cellules VERO, stimulées ou non, infectées par le virus Influenza A H1N1 est réalisée toutes les heures pendant 8 heures après l'infection. La concentration en ARN est mesurée par spectroscopie d'absorbance ("Nanodrop spectrophotometer™") et les échantillons sont normalisés. Après transcription inverse de 500 ng d'ARN total et amplification par PCR, l'analyse par électrophorèse en gel d'agarose permet de suivre la cinétique de la production des deux ARNs messagers (Fig. 46).

Le fragment correspondant à l'amplification du cDNA de M1 est détecté dès la première heure après l'infection dans les cellules non stimulées ; il n'est détecté qu'après la quatrième heure pour les cellules stimulées. De plus, les bandes obtenues à partir des cellules non stimulées sont plus intenses pour chacun des points de la cinétique. A partir de la septième heure, le signal correspondant à la bande M1 n'est plus détecté que pour les cellules n'exprimant pas BoMX1. Celui-ci est cependant plus faible que celui observé après 3, 4 ou 5 heures. Le cDNA correspondant à M2 n'est pratiquement détecté que chez les cellules non stimulées. Sa concentration est maximale après 3 heures. L'expérience indique une diminution nette de la concentration en transcrits correspondant à M1 et M2 pour les cellules stimulées. Le processus d'inhibition intervient très tôt dans le cycle de réplication puisqu'une différence du taux d'ARN codant pour M1 est enregistrée dès la première heure après infection et confirmée par la suite.

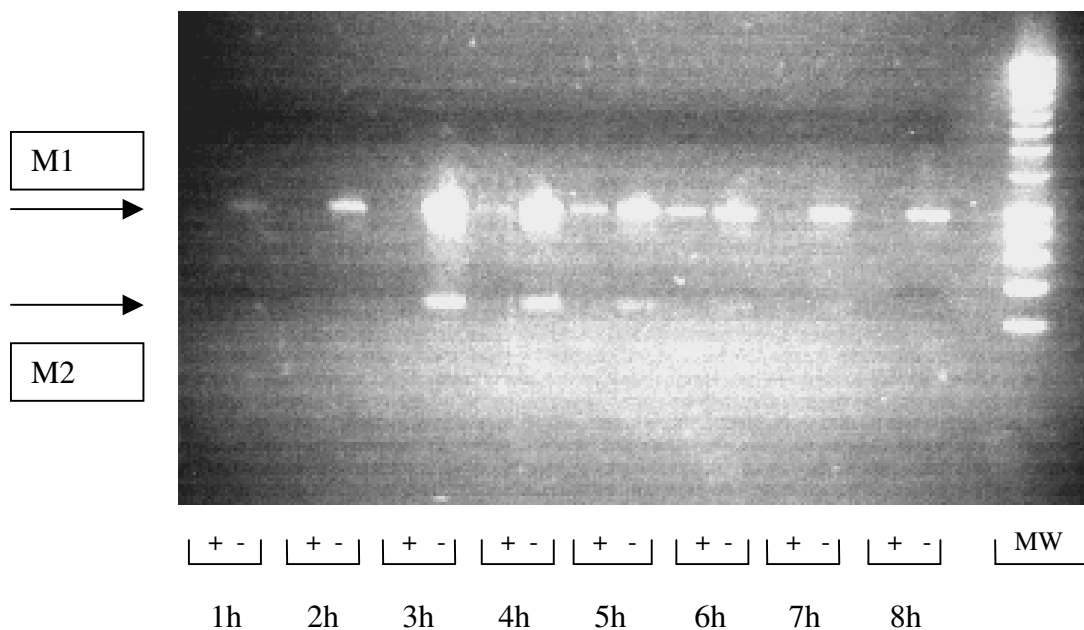


Fig. 46 : RT-PCR semi-quantitative M1/M2. 500 ng d'ARN total extrait de cellules V103 stimulées (+) ou non stimulées (-) infectées par le virus Influenza A H1N1 est amplifié par une RT-PCR sur une période couvrant les huit premières heures après l'infection. Les ARNm analysés (M1 et M2) sont le résultat d'un splicing alternatif. Détectés dès la première heure après l'infection chez les cellules V103-, les transcrits M1 n'apparaissent qu'à partir de la quatrième heure après l'infection, au sein des cellules V103 (+). A ce moment, le maximum de concentration est atteint pour les cellules n'exprimant pas la BoMX1 (-). Les transcrits M2 moins abondants sont clairement identifiés à partir de la troisième heure chez les cellules V103 (-) et restent indétectables, dans les conditions de l'expérience, chez les cellules exprimant la BoMX1 (+).

Ces résultats nous incitent à vérifier par Northern blot cette inhibition et à déterminer si elle concerne la transcription primaire ou secondaire.

III.7. ANALYSE PAR NORTHERN BLOT

III.7.1. PREPARATION DES SONDÉS

Construction génétique

Après extraction de l'ARN de cellules V103 non stimulées et infectées par le virus Influenza A H1N1, une RT-PCR est réalisée à l'aide des amorces NP sens et NP reverse. L'amplicon qui en résulte et dont la migration sur gel d'agarose correspond à celle de sa taille théorique de 293 pb est cloné dans le vecteur PCRII-TOPO que nous appellerons le PCRII-TOPO-NPsonde. Après sélection d'un clone recombinant, celui-ci est orienté par PCR à l'aide des amorces NP reverse et M13 forward, cette dernière correspondant à une séquence du vecteur. La taille du produit PCR est ici encore conforme à l'attente théorique qui est de 400 pb (Fig. 47a et 47b). Après amplification du clone et purification du vecteur recombinant, la séquence à partir des amorces de séquençage présentes sur le vecteur (M13 forward et M13 reverse) nous permet de vérifier la conformité du fragment inséré et son orientation par rapport au promoteur des ARN polymérases virales SP6 et T7 du PCRII-TOPO (Fig. 47c). Cette information est essentielle pour la détermination des sondes que nous allons produire par transcription *in vitro*.

Transcription in vitro

Pour cette expérience, nous avons choisi d'amplifier, à partir du PCRII-TOPO-NPsonde, par PCR, le segment comprenant l'insert et le promoteur ad hoc, d'en purifier le produit directement sur colonne après avoir "tué" le vecteur matriciel par digestion à la *DpnI*. Ce matériel sert de matrice à la transcription réalisée de manière univoque à l'aide de l'ARN polymérase idoine. Préalablement, nous avons optimisé les réactions PCR permettant de générer les sondes ARN complémentaires et anti-complémentaires de l'ARN codant pour la nucléoprotéine virale. L'optimisation de la PCR réalisée par l'application d'un gradient de température d'hybridation fixe ce paramètre aux valeurs de 56.7°C pour les couples NP sens-M13 reverse (Fig. 48) et NP reverse-M13 forward (non présenté). La transcription *in vitro* proprement dite est

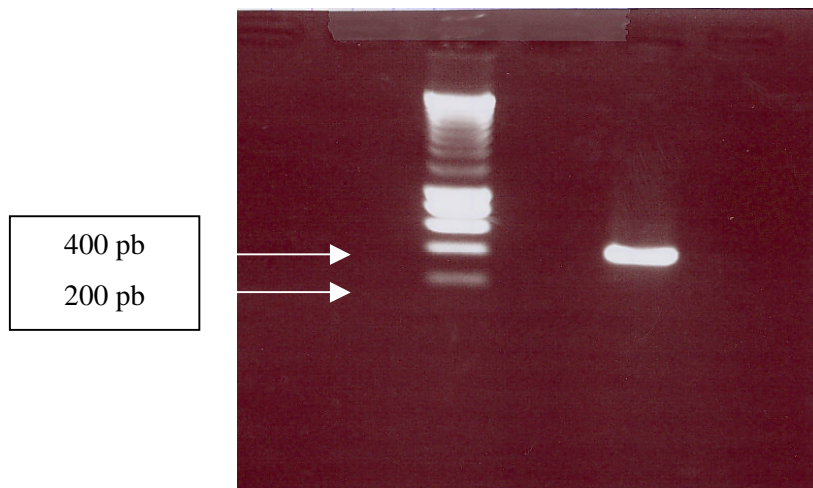


Fig. 47a : Amplification du fragment NP inséré dans le PCRII-TOPO. Les amorces M13 forward et NP reverse génèrent par PCR un amplicon correspondant à la taille théorique attendue (393 pb) correspondant à celle du fragment inséré augmentée du segment séparant le site d'insertion de celui de l'amorce M13forward.

```

cccttgct tcaaaacagc caagtgta caactaacg accaatgag
961 aatcagcac acaagagta actggtgagg atggcatgcc attctgccg atttgaagat
1021 ctaagagtat taagcttcat caaagggacg aaggtgctcc caagagggaa gctttccact
1081 agaggagttc aaattgcttc caatgaaaat atggagacta tggaatcaag tacacttgaa
1141 ctgagaagca ggtactgggc cataaggacc agaagtggag gaaacaccaa tcaacagagg
1201 gcataagg
    
```

Fig. 47b : Séquence de la sonde NP insérée dans le PCRII-TOPO. L'amorce utilisée est le M13 FWD du vecteur. La séquence de l'amorce NP sens est marquée par une flèche. Les numéros correspondent à la séquence CDS complète d'un virus *Influenza A* pris comme référence (*Influenza A* virus (A/Puerto Rico/8/34(H1N1)) avec laquelle notre sonde présente 100% d'identité de séquence. Les parties de séquence soulignées appartiennent au vecteur PCRII-TOPO ; celles en gras, à la séquence de NP.

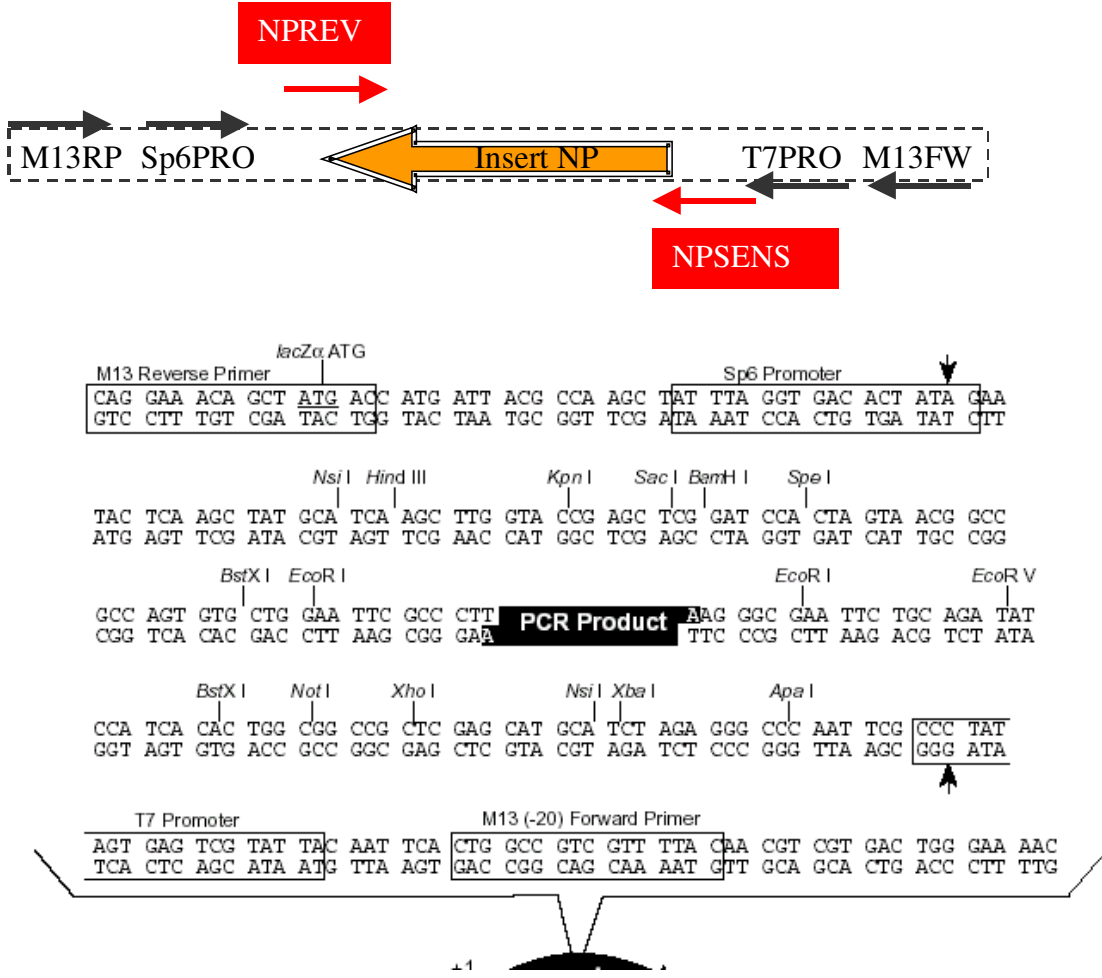


Fig.47c : Orientation de la sonde NP par rapport aux promoteurs SP6 et T7. L'amplification du fragment inséré par PCR à partir des amorces M13 Forward (M13 FW) et NP rev ainsi que les données de séquence placent le promoteur T7 en amont de l'amorce NP sens ; le promoteur SP6 en amont de l'amorce NP reverse.

réalisée à partir de 120 ng de produit PCR purifié. Deux des quatre ribonucléotides, substrats de la réaction de polymérisation, sont modifiés de façon à fournir un produit de synthèse stable vis-à-vis de l'activité RNAsique. Il s'agit des 2'-F-CTP et 2'-F-UTP. La structure générale du transcrit obtenu par l'incorporation de ces bases est présentée à la figure 49a. L'analyse en gel de polyacrylamide de l'ARN obtenu par la transcription *in vitro* (sonde froide) à partir du promoteur T7 montre une bande intense à la taille théorique, à savoir celle du fragment NP augmentée de la séquence traduite à partir du site d'initiation de la transcription (Fig 49b). La concentration mesurée au spectrophotomètre est de 198 ng/μl. Cette sonde froide de polarité positive est ajoutée aux échantillons d'ARN ("spiking") qui seront analysés par Northern blot à raison de 400 pg par échantillon. La sonde radioactive chaude est synthétisée à partir de promoteur SP6 (PCR NPsens M13 Reverse) selon le protocole du fabricant à l'exception d'un ajout d'une concentration plus faible de rGTP froid compensée par 50 μCi de rGT³²P.

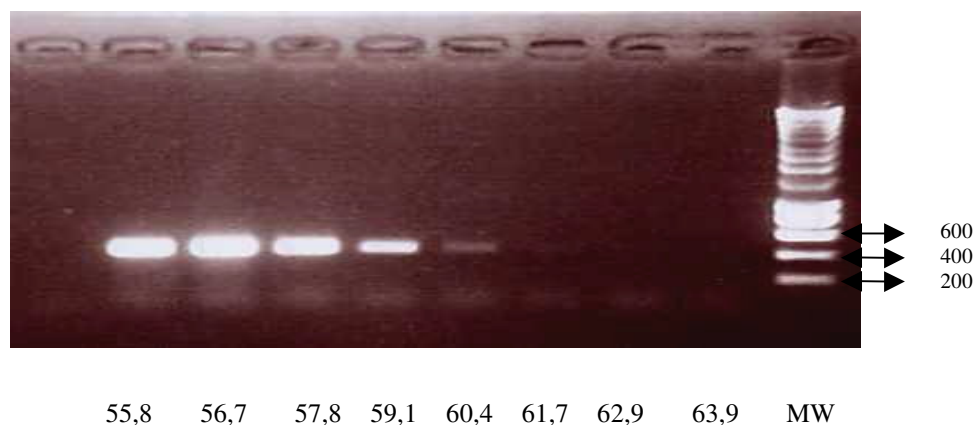


Fig.48. : Optimisation de la PCR pour l'amplification du fragment matrice de la transcription du brin compris entre les amorces NP_{sens} et M13 reverse. La température (en degré Celsius) correspondant à chaque amplicon analysé est indiquée. La température optimale apparente d'hybridation est de 56.7°C.

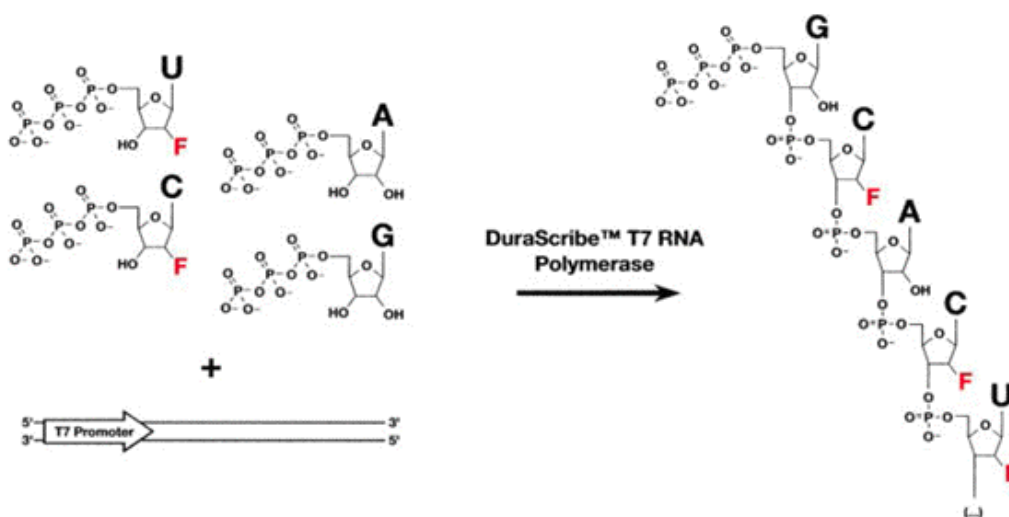


Fig. 49a. Utilisation de bases modifiées. Les bases 2'-F-UTP et 2'-F-CTP sont incorporées par les ARN polymérase T7 (et SP6) pour générer un ARN présentant une résistance élevée à l'activité des ribonucléases (RNase) grâce au remplacement du groupement hydroxyl en position 2 du ribose par un atome de F. La formation des hybrides (duplex ARN-ARN) qui dépend de la complémentarité des bases n'est pas concernée par cette modification.

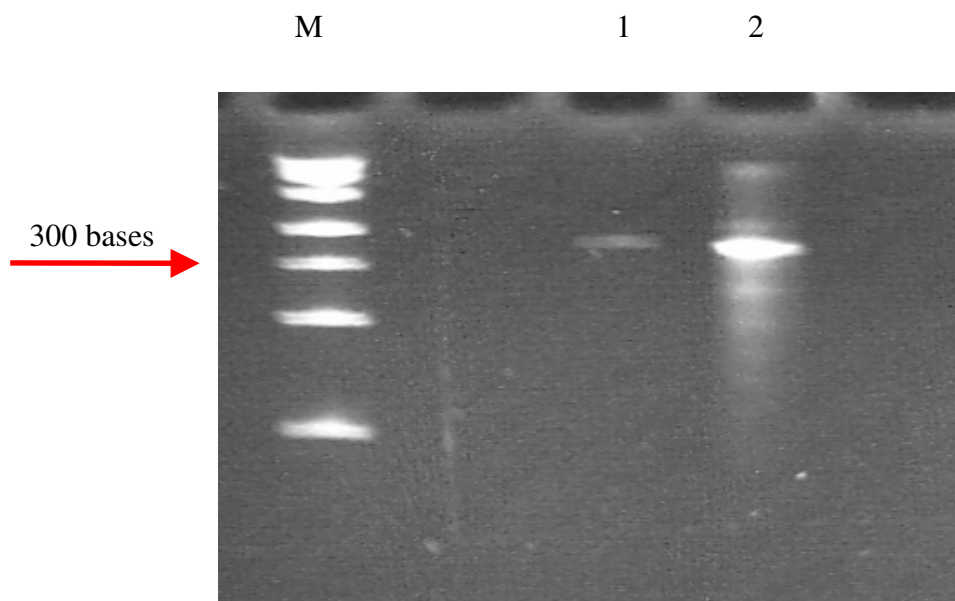


Fig. 49b : Transcription *in vitro*. Un amplicon purifié (120 ng) obtenu par une PCR mettant en œuvre les amorces M13 FWD et NP reverse sur une matrice PCRII-TOPO-NPsonde est transcrit à l'aide de la T7 RNA polymérase pendant 12 h à 37°C. 1 μ l et 0.05 μ l du produit de transcription sont analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide 8 % TBE urée 8 M. M : marqueurs RNA low range, 70 ng/bande (Fermentas) ; 1 : 1 μ l (dilution 20 fois) ; 2 : 1 μ l (non dilué).

Northern blot

L'ARN total est extrait de cellules V103 stimulées ou non, infectées ou non, traitées ou non par la cycloheximide (CHX). Celle-ci est ajoutée à une concentration de 100 μ g/ml 30 min. avant l'infection laquelle est assurée pendant 3 heures par le virus H1N1 à une MOI de 1. Après purification, la concentration en ARN total est déterminée par spectroscopie. La sonde froide NP de polarité positive est ajoutée (400 pg) à chacun des échantillons (2 μ g d'ARN total) avant électrophorèse. La sonde marquée (séquence de polarité négative) est hybridée pendant 12 h à 42°C. Après les lavages successifs, la membrane est auto-radiographiée (Fig. 50). L'ARNm du gène NP du virus H1N1 n'est pas détecté lorsqu'il est issu des cellules infectées V103 exprimant la BoMX1 (STI+) (pistes 1 et 2). Dans le cas des cellules non stimulées, la réponse est positive pour les cellules non traitées à la CHX (6) mais négative pour celles qui le sont (piste 5). Les pistes 3, 4 et 7 constituent les contrôles. La sonde froide positive est détectée avec une intensité identique pour tous les échantillons et témoigne de l'homogénéité du transfert et de la spécificité de l'hybridation. Notre résultat suggère un effet de la CHX sur la synthèse d'ARN viral de polarité positive. Si

cela se vérifie, l'emploi de CHX est sujet à caution dans les expériences visant à identifier la phase de la réplication inhibée par l'expression de BoMX1.

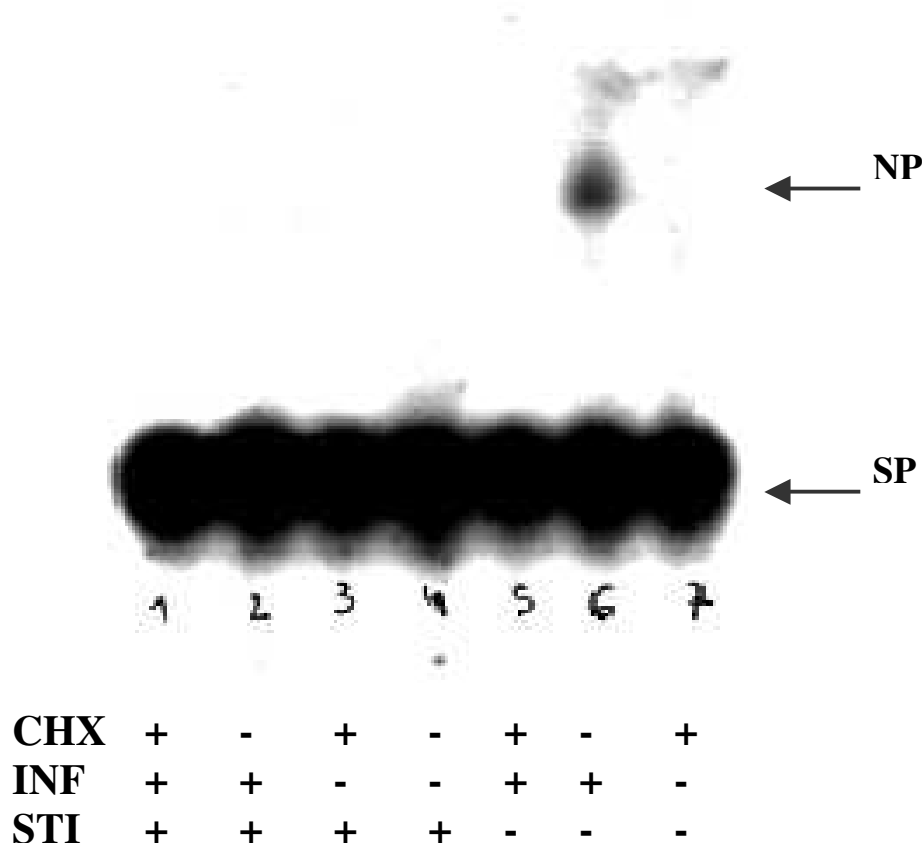


Fig.50 : Analyse du potentiel antiviral de BoMX1 sur la transcription du virus *Influenza A H1N1*.

L'ARN total (2 µg) extrait des cellules V103 est analysé par Northern blot. La sonde de détection est un fragment d'ARN de polarité négative synthétisé *in vitro* et correspondant à une partie du gène NP du virus *Influenza A H1N1*. Une sonde ARN froide complémentaire de polarité positive (SP) a été ajoutée (400 pg/échantillon) avant l'électrophorèse ("spiking"). Les cellules ayant fourni les différents ARNs ont été traitées selon les indications reprises sous la photographie. STI = stimulées ; INF = infectées ; CHX = traitées à la cycloheximide ; NP = Nucléoprotéine. SP = sonde de polarité positive. Voir le texte pour les détails.

III.8. QRT-PCR

III.8.1. INTRODUCTION

L'objectif de la qRT-PCR est de confirmer les résultats obtenus par les deux techniques précédentes à savoir la RT-PCR semi-quantitative et le Northern blot. En particulier, ce dernier a mis en évidence un effet de la cycloheximide sur la production d'ARN de polarité positive qui doit être vérifié.

III.8.2. DONNEES DE LA QRT-PCR

La courbe de dilution a été établie pour l'amplification du fragment de la nucléoprotéine virale et de l'ARN 18S. Les coefficients de régression linéaire (r^2) obtenus sont respectivement 0,94 et 0,92. Deux expériences ont été menées de façon indépendante c'est-à-dire en reprenant tout le protocole depuis l'infection des cellules. Pour rappel, l'infection a été réalisée par le virus *Influenza A H1N1* à une MOI de 1 pendant 3 heures. Après extraction, l'ARN total est quantifié ; la quantité d'ARN soumise à la transcription inverse est normalisée (300 ng). Quatre conditions font partie de l'expérience : cellules infectées et non stimulées, infectées et stimulées, avec ou sans cycloheximide. Les contrôles introduits sont, pour le volet cellulaire, cellules non infectées stimulées ou non ; pour la partie qRT-PCR, matrice sans transcriptase reverse et absence de matrice. Les résultats confirment l'inhibition de la transcription par l'expression de la BoMX1 (rapport V103-/V103+ = ± 3) et l'effet de la CHX seule (rapport similaire). La combinaison des deux effets (expression de la BoMX1 et CHX) génère un rapport ($\pm = 5$) supérieur (Fig. 51). L'inhibition par la CHX rend hasardeuse toute conclusion sur le mécanisme d'inhibition de la transcription.

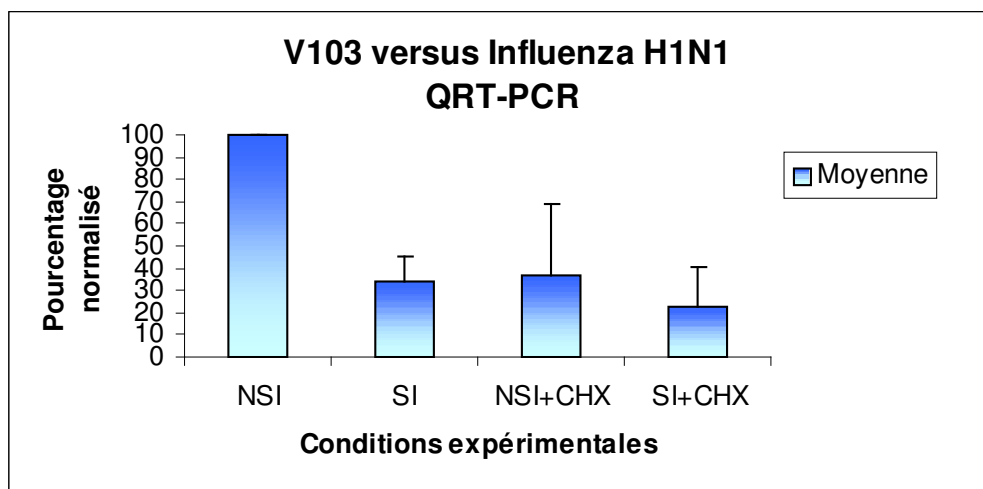


Fig. 51 : Analyse par qRT-PCR de l'effet inhibiteur de BoMX1 sur la synthèse de l'ARNm/ARNc codant pour la protéine NP. Les valeurs (\pm SD) sont exprimées en pourcentage du produit le plus abondant pris comme référence 100. Les résultats représentent la moyenne de deux expériences indépendantes. NSI : V103 non stimulées infectées ; SI : V103 stimulées infectées ; CHX : cycloheximide.

III.9. ANALYSE DES RIBONUCLÉOPROTÉINES VIRALES ENTRANTES PAR RÉACTION D'EXTENSION D'AMORCES

III.9.1. INTRODUCTION

L'inhibition observée que nous venons de démontrer au niveau de la synthèse d'ARNm, par l'expression de BoMX1, n'est pas incompatible avec l'existence d'un phénomène antérieur, à savoir une diminution de la concentration en ribonucléoprotéines entrantes ou vRNPs. L'exploration de ce mécanisme éventuel a été réalisée par l'application de la réaction d'extension d'amorces (primer extension analysis) en présence de cycloheximide. Celle-ci permet, comme l'ont démontré les travaux de l'équipe du professeur G. Brownlee (*Vrede et al.*²⁵⁰), de s'assurer de l'absence d'ARN génomique viral répliqué au sein des échantillons cellulaires.

III.9.2. EXPERIENCES PRELIMINAIRES

Mise au point de la réaction sur ARN viral.

L'ARN viral est purifié à partir d'1 ml du stock de virus H1N1 utilisé pour l'infection des cellules V103. Une réaction d'extension des amorces selon les paramètres définis au chapitre « Matériel et Méthodes » est appliquée par la mise en œuvre de l'amorce vRNANS1 sur cette matrice ARN ou en son absence (contrôle négatif). De plus, un contrôle réalisé sur de l'ARN purifié à partir de cellules V103 (2 µg total) constitue un test supplémentaire. Le produit d'extension analysé par électrophorèse en gel dénaturant de polyacrylamide 8 M urée montre la spécificité de la réaction (Fig. 52a).

Mise au point de la réaction sur cellules V103 infectées

Les cellules V103 non stimulées sont infectées à une MOI de 10 pendant 1 h. L'extension est réalisée à l'aide des amorces cRNANS1 et vRNANS1. Deux échantillons sont réalisés en présence de betaïne. Un contrôle sans matrice mais avec l'amorce vRNANS1 est incorporé dans l'expérience. La quantité d'ARN total des échantillons est fixée à 2 µg. La matrice des extensions réalisées avec les amorces

cRNANS1 et vRNANS1 est en outre strictement identique. Les résultats confirment la spécificité de l'extension (Fig. 52b).

MISE EN EVIDENCE DE L'EFFET INHIBITEUR DE BOMX1 SUR LES RNA VIRAUX

Les cellules V103 traitées 1 h avant l'infection par la CHX (100 µg/ml) ont été infectées aux MOI de 1 et de 10 pendant 1 h. La concentration en ARN total purifié à partir des différentes cultures infectées, a été déterminée et le volume correspondant à la quantité d'ARN total souhaitée, calculé. Le tableau ci-dessous reprend le résultat de la détermination spectroscopique quantitative de l'ARN et du calcul de la normalisation des échantillons.

La réaction d'extension de l'amorce vRNANS1 dont l'autoradiographie est présentée aux figures 53a et 53b met en évidence l'effet de la BoMX1 sur la quantité d'ARN viral génomique infectant, détecté à partir des extraits cellulaires. Cet effet est présent quelle que soit la MOI ; il est particulièrement évident pour la MOI supérieure (MOI \pm =10). De l'ARN viral extrait d'une dose du virus Influenza H1N1 utilisé pour l'infection à la MOI de 10, est soumis à la même réaction d'extension d'amorce et en constitue le contrôle positif. Un temps d'infection court et surtout la présence de CHX permet de limiter la détection à celle de l'ARN génomique viral entrant.²⁵⁰

Tableau 14. Normalisation des concentrations en ARN total des extraits cellulaires impliqués dans la réaction d'extension d'amorce.

Ech.	A260	A280	A260/A280	Concentration (µg/ml)	Concentration échantillon (µg/ml)	Volume (µl)	Volume corrigé (µl)
1	0,84	0,46	1,8	33,6	369,6	7,49	7,5
2	0,96	0,49	1,9	38,4	422,4	6,55	6,5
3	0,95	0,47	2,0	38	418	6,62	6,6
4	0,63	0,35	1,8	25,2	277,2	9,99	10
5	0,87	0,5	1,75	34,8	382,8	7,23	7,2
6	0,84	0,42	2	33,6	369,6	7,49	7,5

*Le numéro des échantillons (1 à 6) correspond à ceux présentés sur les figures 53a et 53b à l'exception du contrôle positif (7) d'origine virale absent de ce tableau.

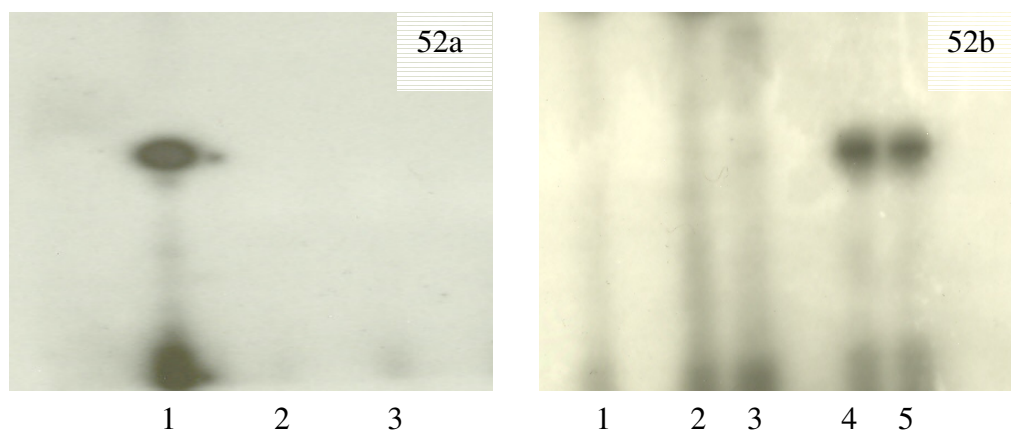


Fig. 52a : Fonctionnalité de la réaction d'extension. La réaction d'extension de l'amorce vRNAS1 ("primer extension analysis") est appliquée à une matrice d'ARN viral purifié à partir du stock viral utilisé pour l'infection des cellules (1) ou sans cette matrice (2). Les mêmes conditions sont appliquées à une matrice normalisée (2 µg) d'ARN purifié à partir de cellules V103 non infectées (3).

Fig. 52b : Spécificité de la réaction d'extension sur cellules V103 infectées. L'ARN total (2 µg) extrait de cellules infectées par le virus Influenza A H1N1 à une MOI de 10 est soumis à la réaction d'extension des amorces cRNAS1 (2 et 3) et vRNAS1 (4 et 5); le contrôle est effectué sur de l'ARN total extrait de V103 non infectées (1).

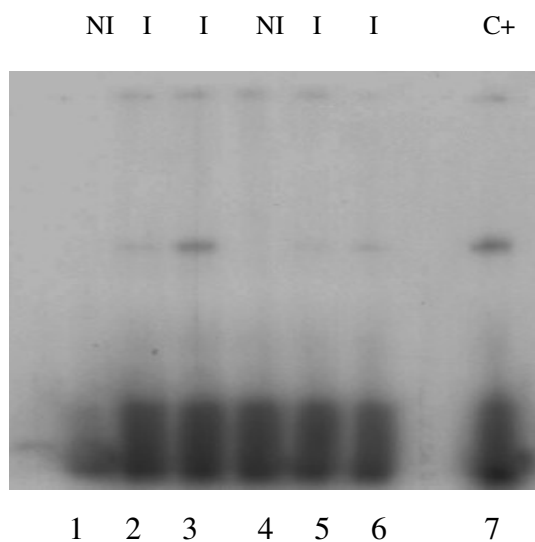


Fig 53a Inhibition de vRNAS1 par BoMX1 en présence de CHX. Vue générale. Les cellules V103, préalablement traitées par CHX (100 µg/ml – 1 h), non infectées (puits 1 et 4) ou infectées pendant 1 h à une MOI de 1 (puits 2 et 5) ou de 10 (puits 3 et 6) sont analysées par la réaction d'extension d'amorce spécifique du vRNA de NS1. Les puits 1, 2 3 et 4, 5, 6 correspondent respectivement aux extraits de V103 BoMX1- et V103 BoMX1+; le puits 7 (contrôle positif) est obtenu à partir d'une matrice constituée d'ARN viral purifié. NI : non infecté ; I : infecté. Une

différence remarquable de rendement est observée pour les extensions d'amorces réalisées à partir des extraits de cellules V103- et V103+ infectées à une MOI de 10 (puits soulignés 3 et 6)

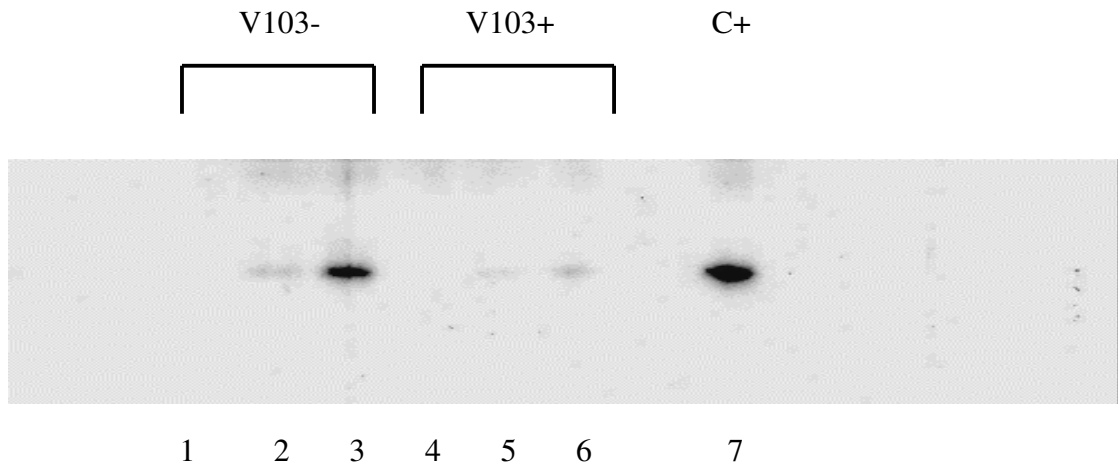


Fig.53b : Inhibition de vRNAS1 par BoMX1 en présence de CHX. Vue rapprochée. Les cellules V103, préalablement traitées par CHX (100 µg/ml – 1 h), non infectées (puits 1 et 4) ou infectées pendant 1 h à une MOI de 1 (puits 2 et 5) ou de 10 (puits 3 et 6) sont analysées par la réaction d'extension d'amorce spécifique du vRNA de NS1. Les puits 1, 2, 3 et 4, 5, 6 correspondent respectivement aux extraits de V103 BoMX1- et V103 BoMX1+ ; le puits 7 (contrôle positif) est obtenu à partir d'une matrice constituée d'ARN viral purifié.

III.10. INTERACTION POTENTIELLE DYNAMINE 2 ET BOMX1

III.10.1. INTRODUCTION

Les résultats présentés ci-dessus montrent une action précoce de la BoMX1, potentiellement capable de limiter l'adhésion et/ou la pénétration des virions d'*Influenza A* dans le compartiment cytoplasmique de la cellule hôte. Les mécanismes d'infection par ce pathogène sont aujourd'hui encore largement en cours d'étude. L'implication de la voie générale de l'endocytose – même si elle n'est pas forcément la seule – est préférentiellement choisie par ce virus. Le nombre de facteurs concernés dans le trafic des vésicules infectantes depuis leur formation au niveau de la membrane cytoplasmique jusqu'à leur destination périnucléaire est très important et sans doute pas encore entièrement connu. Cependant, nous avons été tenté, par l'hypothèse d'une interaction entre un de ces facteurs, la dynamine 2 ubiquiste et la BoMX1, deux molécules appartenant à la même superfamille et capables de former des oligomères. Cette première approche est basée sur l'analyse d'images obtenues en immunofluorescence.

III.10.2. DYNAMINE 2 ET BOMX1

Un double immunomarquage de cellules V103 stimulées ou non par des anticorps dirigés contre la dynamine 2 ubiquiste est effectuée à l'aide d'anticorps de souris anti-BoMX1 et d'anticorps polyclonal de lapin anti-dynamine 2 de rat. L'immunodétection est réalisée par des anticorps secondaires porteurs respectivement des fluorochromes Alexa fluor 488TM et Alexa fluor 568TM (Molecular Probes. USA). La superposition des images obtenues en épifluorescence montre la spécificité du marquage (Fig. 54) et indique une cytolocalisation générale identique des deux molécules (Fig. 55). Par contre, la complexité des images obtenues par l'observation en immunofluorescence ne nous autorise pas à affirmer que nous sommes en présence d'une interaction moléculaire directe entre dynamine 2 et protéine BoMX1. Une analyse plus fine est réalisée par l'application d'un filtre digital (filtre de REIMER) qui permet d'obtenir une image calculée sur la base de surfaces définies présentant une même fluorescence moyenne (courbe d'isodensité). L'interprétation reste cependant délicate : les courbes de densité ne sont pas directement superposables mais des

courbes proches et parallèles tant au niveau de la membrane cytoplasmique que nucléaire laissent supposer l'interaction avec des sous-structures cellulaires proches voire identiques (Fig. 56).

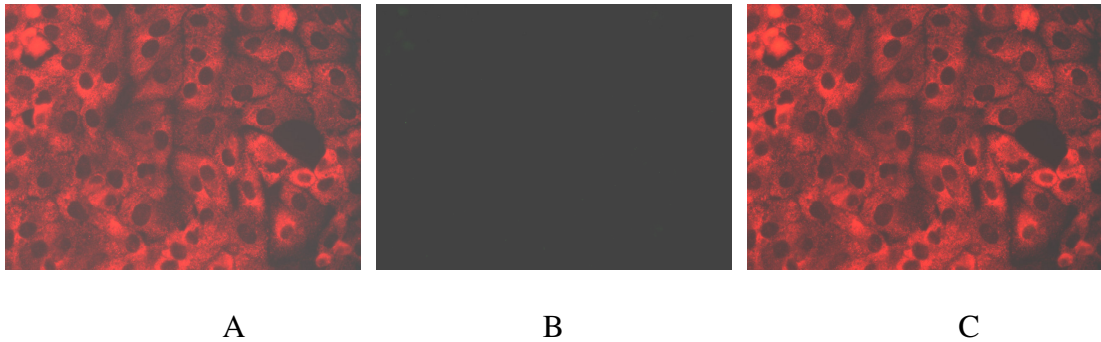


Fig. 54 : Analyse en immunofluorescence de la spécificité des anticorps mis en oeuvre. Les cellules V103 non stimulées marquées par les anticorps anti-dynamine 2 (A) et anti-BoMX1 (B) montrent une absence de réaction croisée entre les anticorps dirigés contre la protéine virale bovine et la dynamine 2. L'image résultante C obtenue par addition numérique de A et B est indiscernable de l'image (A). Grossissement 400x. Epifluorescence.

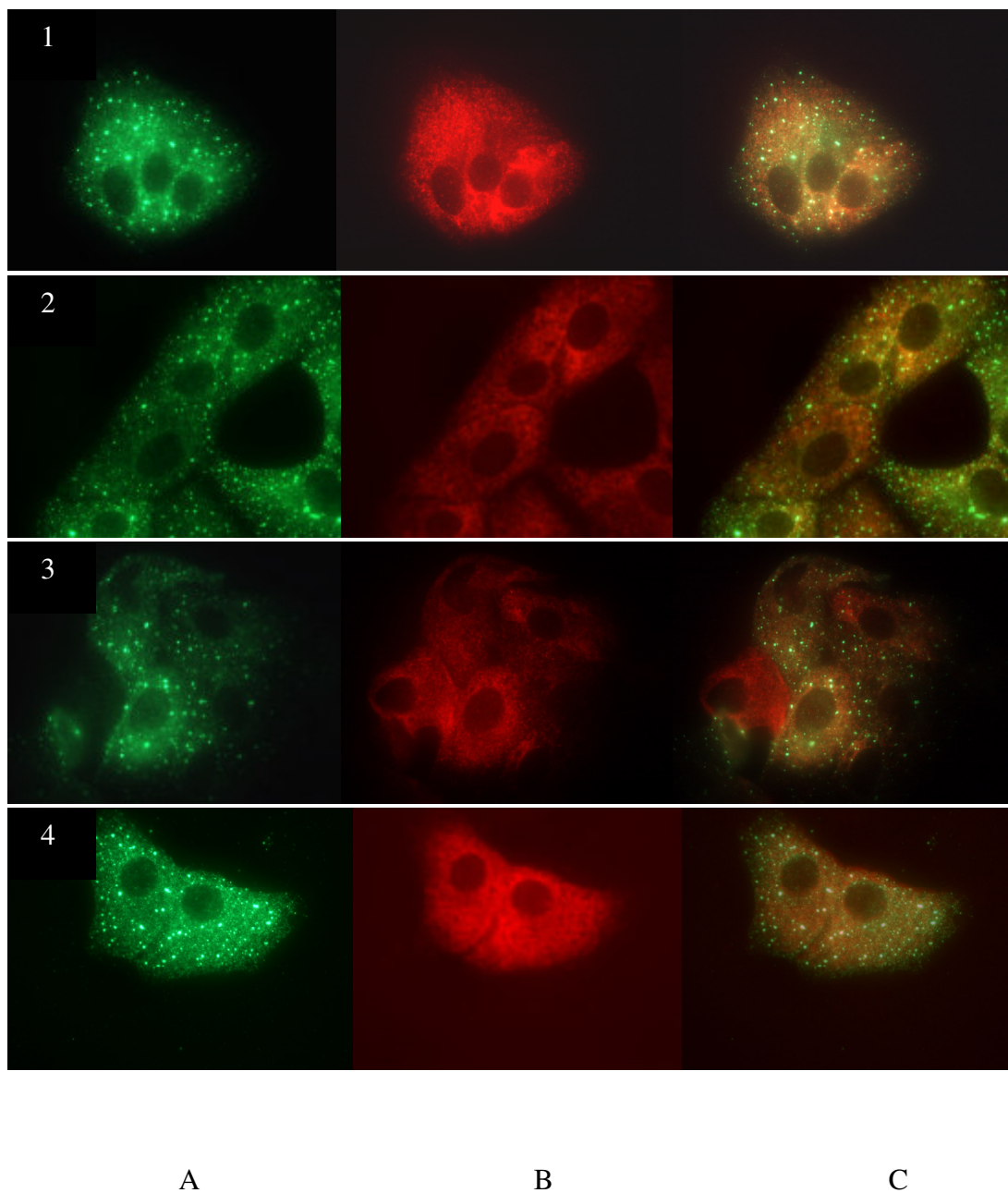


Fig. 55 : Analyse en immunofluorescence de l'interaction potentielle BoMX1-dynamine 2. Les cellules V103 stimulées ont subi un double marquage par des anticorps polyclonaux anti-BoMX1 de souris (A) et anti-dynamine 2 de lapin (B). La superposition des images indique une co-localisation générale au niveau cytoplasmique des deux protéines. Le marquage localement granuleux présent au niveau des cellules de la colonne A ne se retrouve pas en B. Une cellule des images du champ 3 non induites est nettement distinguable sur la photo résultante (C3). Grossissement 1000x. Epifluorescence.

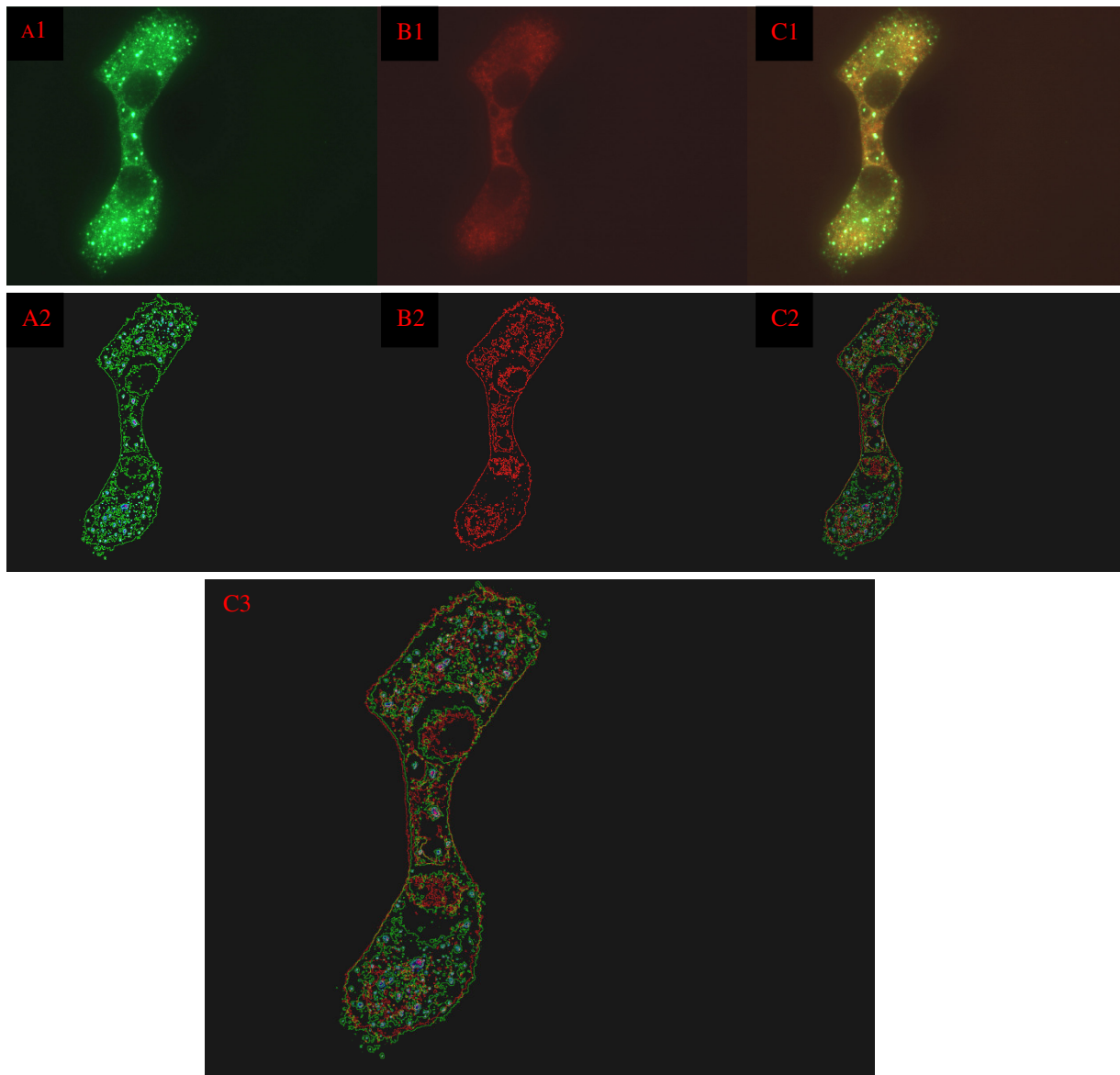


Fig.56 : Courbes d'isodensité. Les images obtenues en immunofluorescence sont traitées par l'application d'un filtre digital (filtre de Reimer) qui génère une image d'ordre 2 constituée de courbes obtenues à partir de zones présentant une même densité. Les cellules marquées par les anticorps anti-BoMX1 et anti-dynamine 2 apparaissent en vert et rouge respectivement (A1 et B1) ; les images dérivées respectent le même code couleur (A2 et B2). Remarquons la présence de zones de densité plus élevée (bleu) correspondant aux granules formés par la BoMX1 (A2 et C2), absentes en B2. Les images résultant de la superposition des images obtenues en épifluorescence et leurs images dérivées sont présentées respectivement en C1 et C2. Cette dernière et son agrandissement (C3) montre des courbes rouges et vertes proches mais rarement superposées comme en atteste l'absence quasi totale de la couleur jaune.

IV. Discussion

IV.1. INTRODUCTION

Notre objectif initial était l'étude, *in vitro*, de l'activité antivirale de la MX1 bovine vis à vis des virus respiratoires de la famille des *Paramyxoviridae*, BoPI3 et BoRSV. Aucune information relative aux propriétés antivirales de la protéine ne figurait à l'époque dans la littérature. Cette absence nous contraignit dans un premier temps à démontrer son pouvoir inhibiteur face à un virus modèle, largement mis à contribution dans le microcosme MX et des protéines antivirales interféron-dépendantes : le VSV appartenant à la famille des *Rhabdoviridae*. La première partie du travail s'est naturellement articulée autour de cette recherche de virus sensibles à l'action de BoMX1 ; la seconde a contribué, en liaison avec la première, au décodage du mécanisme sous-jacent. Ces aspects ne pouvaient être abordés qu'à la condition *sine qua non* de disposer d'un système d'expression efficace de la MX1 bovine en cellules permissives aux différentes espèces virales.

IV.2. ETUDE DE L'INHIBITION DE DIFFÉRENTS VIRUS PAR L'EXPRESSION DE BOMX1.

IV.2.1. LA LIGNEE INDUCTIBLE V103

La lignée que nous avons établie possède par rapport à celles utilisées dans les études *in vitro* menées jusqu'à présent dans ce domaine, l'avantage d'être inductible et régulée d'une façon très stricte. Elle nous garantit la possibilité d'obtenir une mesure de l'inhibition indépendante de paramètres relatifs à la dérive apparaissant entre lignées cellulaires contrôles et transfectées. Son établissement a été rendu délicat suite au phénomène d'extinction des clones productifs, phénomène qui découle du contrôle épigénétique du promoteur fort CMV, riche en îlots CpG. La "résurrection" des clones par l'action de la seule TSA, un inhibiteur des histones déacétylases, a été démontrée,

la 5'AZA dont l'action concerne l'hyperméthylation de l'ADN, se révélant, par contre, inopérante. Le clone V103 finalement retenu offre un taux d'expression basal proche de 0% et supérieur à 99% après induction. De plus, en cellules V103 induites, le taux de production en protéines spécifiques tel qu'estimé par Western blot et immunodétection est comparable à celui obtenu après stimulation à l'interféron de cellules MDBK. Enfin, la présence d'une concentration intracytoplasmique élevée en BoMX1 se maintient pendant plus de 48 h et ne modifie pas la viabilité cellulaire.

IV.2.2. BOMX1 ET LE VSV

L'inhibition de la réplication du VSV exercée par BoMX1 a été démontrée, pour les souches Indiana et New Jersey, au moyen des techniques de titration directe et indirecte appliquées à des cellules V103 stimulées ou non. Cette dernière, par la comparaison des valeurs de TCID₅₀ obtenues pour des MOI de 0.1 et 1, nous fournit un facteur d'inhibition de l'ordre de 1000. Cette valeur est supérieure d'un ordre de grandeur à celles enregistrées pour l'expression de la MX1 du rat et de son *alter ego* humain, la MXA^{258, 259}. La capacité antivirale de BoMX1 sur un virus a donc bien été démontrée ici pour la première fois²⁶⁰.

IV.2.3. BOMX1 ET PARAMYXOVIRIDAE

BOMX1 ET LE VIRUS PARAINFLUENZA DE TYPE 3 BOVIN (BOPI3)

L'arsenal technique mis en place pour cette étude comprenait classiquement la titration directe et indirecte mais aussi l'immunofluorescence, le test MTS et la cytométrie en flux. Tous les résultats concourent à une même conclusion : l'expression de BoMX1 n'a aucun impact sur la réplication du BoPI3²⁶¹. Cette constatation peut paraître surprenante surtout si nous la comparons aux conclusions trouvées dans la littérature pour la version humaine de ce virus (le hPIV3) et la MXA²⁶². Le rôle essentiel de l'inhibition par les interférons de type I y est attribué à la protéine induite

MXA laquelle atténuerait la réplication du virus d'un facteur 100. Cependant, une étude plus récente minimise l'impact de la GTPase dans l'acquisition d'une résistance à hPIV3 et met en avant l'existence d'une voie interféron-dépendante alternative.²⁶³

BOMX1 ET LE VIRUS RESPIRATOIRE SYNCYTIAL BOVIN (BORSV)

L'analyse de l'interaction entre BoMX1 et la réplication du Pneumovirus BoRSV a bénéficié d'une approche expérimentale identique à celle de BoPI3. Une même conclusion s'impose : BoMX1 ne peut atténuer la réplication de BoRSV *in vitro*. Par contre, ce résultat n'est guère surprenant et est conforme aux observations publiées pour le couple MXA et HuRSV²⁶⁴. L'extension à d'autres *Paramyxoviridae* nous a d'ailleurs permis de confirmer l'absence de potentiel antiviral de BoMX1 vis-à-vis des virus appartenant à cette famille²⁶⁴.

IV.2.4. BOMX1 ET ORTHOMYXOVIRIDAE

Après avoir établi la cinétique de réplication du virus Influenza A H1N1, souche porcine, en cellules Vero, l'analyse en cytométrie en flux de cellules exprimant transitoirement les protéines MXA et BoMX1 et infectées par des doses identiques du virus, révèle une diminution significative des cellules infectées au sein des populations exprimant les protéines antivirales. La différence du taux d'infection, observé au cours de deux expériences indépendantes, entre cellules MX positives et négatives, apparaît 2 à 3 fois plus élevée pour la version bovine comparée à la version humaine. Celle-ci, dont l'activité inhibitrice sur la réplication des *Orthomyxoviridae* est solidement démontrée, nous a servi de contrôle positif^{265, 266, 267}.

La titration directe effectuée sur la lignée V103 offre une vision spectaculaire de la protection conférée par l'expression de BoMX1. L'inhibition de la réplication est tout aussi évidente lors du suivi, en double immunofluorescence, de la progression du taux d'infection. Chez les V103+, après plusieurs cycles de réplication (i.e. 24 h après infection à une MOI de 0.1) les cellules positives sont absentes ou rares sur les différents champs de l'observation microscopique ; elles sont toujours présentes et

largement représentées chez les cellules V103-. Cette différence dans le taux d'infection observé s'installe dès le premier cycle.

BoMX1 possède un potentiel antiviral évident face à un virus Influenza A H1N1 appartenant à la catégorie dite de "faible virulence", mais peut-il être étendu à des souches plus agressives ? La quantification par la méthode de titration indirecte de l'impact de la GTPase bovine sur le virus hypervirulent Influenza A H7N7 nous apporte non seulement une confirmation de ce potentiel mais elle nous permet d'en mesurer toute l'étendue. En effet, le degré de protection conféré par l'expression de BoMX1 dépasse 10^8 à la MOI de 0.5 et n'est pratiquement pas mesurable aux MOI inférieures suite à l'absence quasi totale de particules virales dans les surnageants à titrer. Ces valeurs et cette puissance inhibitrice sont supérieures à ce qui a été décrit pour MXA versus Influenza A ; elles ont été enregistrées pour MXA versus le *Thogotovirus*, un membre de la famille des *Orthomyxoviridae*²⁶⁸.

IV.3.MÉCANISME D'INHIBITION DU VIRUS INFLUENZA A PAR BOMX1

IV.3.1. INTRODUCTION

Le mécanisme d'action des protéines MX reste largement inconnu. Certains auteurs ont proposé une interaction entre la protéine, par l'intermédiaire de son domaine effecteur (GED), et certains facteurs viraux. En particulier, MXA réduit d'un facteur 1000 la réplication du virus de la fièvre hémorragique Crimée-Congo, un *Bunyaviridae* appartenant au genre Nairovirus. La co-immunoprécipitation de sa nucléoprotéine (NP) avec la GTPase native est documentée et une colocalisation périnucléaire partielle des deux macromolécules est mise en évidence par immunofluorescence. La capacité antivirale et l'interaction avec la NP est perdue pour le mutant E645R²⁶⁹. Une interaction similaire de MXA, modifiée par insertion d'un site de translocation nucléaire, avec la NP du virus Influenza A traduite à partir d'un mini-génome est décrite²⁷⁰. L'inhibition spectaculaire de la réplication du *Thogotovirus* par MXA semble résulter d'une interaction avec la protéine NP de la nucléocapside infectante bloquant le transfert nucléaire de celle-ci^{269, 271}. Dans le même ordre d'idées, la nucléocapside néoformée du virus de La Crosse apparaît comme séquestrée dans des complexes périnucléaires²⁷². Contrairement à la protéine humaine qui conserve son activité après translocation nucléaire, MX1 perd sa capacité antivirale lorsqu'elle est rendue cytoplasmique²⁷³. Sa cible virale serait également différente et constituée par la sous-unité PB2 de la polymérase virale²⁷⁴.

Une partie des recherches initialement menées s'est focalisée sur l'étape-cible de BoMX1 dans le cycle répliatif viral. Clairement, une inhibition de la synthèse des ARNm est observée par l'expression de MXA et de MX1^{275, 276}. Une distinction est établie entre MX nucléaire et cytoplasmique, la première interférant avec la transcription primaire au niveau du noyau, la seconde avec une étape ultérieure se déroulant dans le cytoplasme²⁷⁷.

Les investigations mécanistiques ont évidemment fait appel à l'analyse mutationnelle de MXA et de MX1. Pour cette dernière, une mutation au niveau du site de fixation au GTP (S50I), modifie la distribution nucléaire de la MX1 et lui fait perdre son activité GTPase et anti- Influenza A²⁷⁸. Cette expérience est la confirmation d'observations antérieures²⁷⁹. Remarquons que l'analyse par mutation ponctuelle

montre rapidement ses limites puisque sur 14 mutants éprouvés *in vitro*, aucun ne conserve l'activité antivirale parentale. La perte d'activité semble ici corrélée avec une distribution altérée au sein du noyau²⁸⁰.

La même approche appliquée à MXA souligne la liaison entre l'activité enzymatique et la structure oligomérique sans perte obligée du potentiel antiviral. En effet, le mutant L612K est monomérique et incapable d'hydrolyser le GTP mais reste actif contre le Thogoto virus et le VSV²⁸¹. Par contre, le mutant T103A perd à la fois sa qualité de catalyseur biologique et d'inhibiteur de la réplication de l'Influenza A. De plus, un effet dominant négatif sur le type sauvage est observé lorsque ce mutant est co-exprimé avec le type sauvage par la formation d'hétéro-oligomères. Une version tronquée des 90 derniers acides aminés du mutant lui fait perdre son interférence avec l'activité biologique naturelle de MXA, mettant ainsi en lumière l'importance de la partie COOH terminale dans le processus d'oligomérisation²⁸². Le mutant à activité GTPasique positive E645R présente la particularité de voir son spectre antiviral modifié par la perte de son potentiel anti-VSV, tout en conservant ses caractéristiques vis-à-vis de l'Influenza A et du Thogoto virus²⁶⁸.

D'autres auteurs ont proposé un mécanisme d'action qui ne passe pas par une interaction directe avec une cible virale. Ainsi, selon Engelhardt, la réplication du virus Influenza A serait entravée par interaction de MX1 avec la protéine PML (*Promyelocytic Leukaemia Protein*) des corps nucléaires (*Nuclear Bodies* ou NB)²⁸³. Ces PML NB et d'autres corps nucléaires appelés corps de Cajal (*Cajal bodies*) sont des organelles mobiles présents dans le noyau et dont les fonctions biologiques comprennent la régulation de la transcription et les modifications post-transcriptionnelles du RNA. Une protéine MX1 rendue fluorescente par fusion colocalise respectivement à 50% et 34% avec les corps de Cajal et les PML NB. Toutefois, cette MX1 fusionnée ne présente plus d'activité antivirale²⁸⁴. Pour sa part, MXA est capable, à l'instar des dynamines de haut poids moléculaire, typiquement de Dyn2 et de DLP1, de s'auto-assembler, de s'associer aux lipides et de remodeler les membranes lipidiques. A ces propriétés classiques des dynamines, il convient d'ajouter une interaction avec la membrane du réticulum endoplasmique lisse *in vivo*²⁸⁵. La combinaison de ces observations conduit naturellement à une approche du mécanisme antiviral complexe des protéines MX sur base de propriétés plus générales, caractéristiques de leur famille moléculaire. A ce sujet, l'inhibition du transport des vRNPs entrants par la MXA se conçoit bien dans un système d'interaction générale

avec les mécanismes d'entrée de plusieurs familles virales dont celle des *Orthomyxoviridae*, mécanismes faisant appel à l'endocytose^{286,287}.

IV.3.2. BOMX1 ET L'ARN VIRAL

A partir d'une concentration normalisée en ARN total extrait de V103 stimulées ou non, l'étude préliminaire au moyen d'une simple RT-PCR a montré que l'expression de BoMX1 inhibe la synthèse de l'ARN viral. Ce résultat est étonnant dans la mesure où l'inhibition est détectable dès la fin de la première heure du premier cycle de réplication virale lorsque nous considérons la transcription d'ARN codant pour la protéine M1. La synthèse de l'ARN codant pour M2, et par conséquent son inhibition, sont indétectables avant la troisième heure. Remarquons que le choix de l'amplification d'un ARN viral qui est le fruit d'un splicing alternatif régulé, associée à l'analyse par électrophorèse en présence de marqueurs de taille, offre une garantie quant à la nature de l'acide nucléique détecté, i.e. l'ARNm.

Dans notre effort de confirmer cette inhibition, nous nous sommes tournés vers une analyse par Northern blot mettant en œuvre une sonde ARN de polarité négative complémentaire de l'ARNm NP. Afin de déterminer si cette inhibition était antérieure ou postérieure à la transcription primaire, nous avons réalisé l'expérience en présence ou en absence de cycloheximide (CHX). Les résultats ont confirmé l'effet négatif de BoMX1 sur la synthèse de l'ARN codant pour la NP. Toutefois, les contrôles incorporés dans notre approche expérimentale, ont révélé un effet identique pour la CHX seule, invalidant la tentative relative à l'identification de l'étape concernée par l'inhibition. Cette activité de l'inhibiteur de la traduction sur les ARNm du virus Influenza A a été décrite par Vrede et *al.* en 2004²⁸⁸.

Enfin, une qRT-PCR destinée à la mesure quantitative de l'ARNm NP produit par les cellules V103 infectées par le virus *Influenza A H1N1* montre que BoMX1 en réduit de 70% la concentration en transcrits, la CHX de 60%. La combinaison des deux inhibiteurs élève cette valeur à 80% dans les conditions de notre expérience. La qRT-PCR est en parfait accord avec les résultats antérieurs et souligne les difficultés liées à l'utilisation de CHX dans l'étude des mécanismes de l'inhibition de la transcription virale de l'Influenza A.

IV.3.3. INHIBITION DES RIBONUCLEOPROTEINES ENTRANTES

Cette inhibition est démontrée à l'aide de la technique d'extension d'amorce. Le problème de son application dans le cas d'une infection par un virus à ARN de polarité négative est de limiter la détection au seul ARN viral génomique entrant. Pour obtenir ce résultat nous avons choisi de limiter le temps d'infection à 1 h, temps pendant lequel la quantité d'ARN progéniture est pratiquement inexistante. De plus, l'emploi de cycloheximide est ici un avantage puisqu'il a été démontré qu'elle réduit à des niveaux non détectables la réplication virale pendant la durée normale d'un cycle répliatif soit 7 à 8 heures. Après avoir démontré à l'aide d'expériences préliminaires la spécificité de la réaction ciblant le gène viral NS1 de la souche Influenza A H1N1 d'origine porcine, nous avons pu étudier l'effet de BoMX1 sur la concentration intracellulaire relative de l'ARN entrant. La normalisation des concentrations en ARN total extrait des cellules, outre sa logique intrinsèque dans le cas d'une comparaison relative de la quantité en un ARN spécifique, montre l'homogénéité des différents échantillons analysés et permet d'éliminer un effet lié à leur préparation dans l'analyse des différences observées. Dans ces conditions, l'expression de BoMX1 correspond à une diminution très nette du signal. Notons cependant qu'une MOI calculée de 10 est nécessaire pour obtenir une intensité de bande sans inhibition permettant de visualiser de manière confortable l'impact de BoMX1 ; à une MOI théorique de 1, le signal obtenu en absence de la protéine antivirale correspond approximativement à celui d'une infection à une MOI de 10 en sa présence.

De façon plus fondamentale, la réaction d'extension d'amorce indique une activité de la GTPase bovine précoce, antérieure à la transcription primaire. Elle rejoint en cela les données relatives à l'inhibition du Thogoto virus par MXA, laquelle est active sur les ribonucléoprotéines virales en amont de leur intégration nucléaire.

IV.3.4. INTERACTION POTENTIELLE AVEC LA DYNAMINE2

La dynamine2, une GTPase de haut poids moléculaire ubiquiste, est impliquée dans les mécanismes de trafic cellulaire. La BoMX1 est capable d'inhiber les ribonucléoprotéines entrantes très tôt dans le processus d'infection. Il était donc extrêmement tentant de se laisser séduire par un mécanisme d'inhibition passant par une interaction entre la dynamine2 et la protéine antivirale. Les expériences d'immunofluorescences confirment la distribution cytoplasmique similaire des deux

protéines. Cependant, une analyse plus fine de l'image superposée des marquages BoMX1 et dynamine2, par application d'un filtre digital générant des courbes d'isodensité, permet de définir des patterns différents. En particulier, les amas hyperdenses présents chez BoMX1 ne trouvent pas d'écho dans le marquage de la dynamine2. Une interaction partielle ne peut cependant pas être, à ce stade, exclue. De même, une régulation fonctionnelle par l'intermédiaire d'un ou de plusieurs partenaires intermédiaires n'est pas incompatible avec les images obtenues.

IV.4. CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

L'objet initial de nos travaux était l'étude de l'impact potentiel sur la réplication des virus respiratoires bovins de la MX1 bovine. Clairement, nous avons démontré que le BoPI3 et le BoRSV étaient indifférents à la présence de cette protéine. Cette incapacité à contrarier ces deux virus a été étendue à une série de représentants de la famille des *Paramyxoviridae* couvrant les différents genres des deux sous-familles (*Paramyxovirinae* et *Pneumovirinae*) suggérant une résistance générale à la BoMX1. Par contre, celle-ci inhibe le VSV conformément à l'attente et, surtout, possède une activité antivirale extrêmement puissante contre les souches du virus Influenza A, y compris les plus virulentes. Il est piquant ici de souligner qu' en dépit de l'absence d'une maladie cliniquement caractérisée, des symptômes frustrés ont été associés au virus Influenza A chez la bête bovine et la présence d'anticorps spécifiques correspondant aux sérotypes circulants a été détectée^{289,290}. Aucun virus n'a cependant pu être isolé à partir du mucus des animaux, indiquant une limitation de la réplication virale.

En l'appliquant au modèle Influenza A *in vitro*, nous avons abordé l'étude du mécanisme d'action de la BoMX1 en essayant d'en mettre en évidence le "*primum movens*". L'immunofluorescence nous a clairement indiqué que celui-ci était présent dès la première partie du premier cycle. Globalement, un effet inhibiteur est visible au niveau de la synthèse d'ARN ainsi que l'ont montré les approches par RT-PCR semi-quantitative, Northern blot et qRT-PCR. Précédent l'étape de transcription, l'entrée du virus est elle-même contrariée par la BoMX1. Ainsi, le signal obtenu par la technique d'extension d'amorces est manifestement plus faible pour les cellules exprimant la GTPase. A ce stade, il est impossible de déterminer si nous sommes en présence d'une interaction ayant pour objet la destruction des vésicules formées au cours de l'entrée du virus Influenza A ou si l'entrée du virus elle-même est empêchée.

Les découvertes récentes apportées par l'utilisation de techniques combinant le marquage fluorescent et la microscopie en temps réel ou "real time imaging" permettent d'avoir une idée plus précise de la succession d'événements depuis l'adhésion du virus Influenza A à la membrane cellulaire et les différentes étapes de l'endocytose clathrine-dépendante précédant l'intégration nucléaire. Trois phases sont discernables. Le stade I pendant lequel les mouvements du virus sont lents et limités à

la périphérie cellulaire ; le stade II se caractérise par sa rapidité et sa trajectoire linéaire qui amène la vésicule contenant la particule virale dans la région périnucléaire; le stade III est constitué de mouvements intermittents, bi-directionnels, et circonscrits à la région périnucléaire. L'utilisation de substances inhibitrices de la structure de l'actine, des microtubules et des anticorps anti-dynéine ont permis de montrer que le stade I dépend de l'actine et le stade II du mouvement de la dynéine sur les microtubules. Le stade III serait associé à la mobilité des extrémités microtubulaires. Les mouvements du stade I concernent en partie les mouvements à la surface de la cellule ; les stades ultérieurs, celui des endosomes contenant la particule virale à l'intérieur de la cellule²⁹¹. De l'adhésion à la fusion, 8 minutes environ (500 secondes) s'écoulent. Ce temps est identique lorsque le virus pénètre par la voie caveoline-dépendante et la décomposition du mouvement de la vésicule contenant la particule virale (caveosome) en 3 stades est similaire²⁹².

La MX1 bovine, structurellement proche des dynamines et partageant une même cytolocalisation cytoplasmique, pourrait contrarier, dès la formation de la vésicule endosomale, l'activité de la dynamine 2. Cette dernière participe à l'internalisation à la fois des CCPs (*clathrin coated pits*) et des *caveolae* via un processus de fission dépendant du GTP^{293,294}. Son rôle est essentiel mais nécessite la présence d'autres facteurs, les mécanismes d'endocytose se révélant assez complexes^{295,296}. Remarquons que l'inhibition de l'activité de la dynamine au moyen d'un inhibiteur spécifique bloque la formation des CCPs²⁹⁷. En outre, l'inhibition du mécanisme de l'endocytose par la voie des CCPs réduit le taux d'infection par un virus faisant partie de notre étude à savoir le VSV²⁹⁸. Enfin, l'effet inhibiteur de l'expression du mutant dominant négatif de la dynamine 2 K44A sur le succès de la réplication a été démontré pour un virus infectant les cellules par la voie clathrine-dépendante, le rhinovirus de type 2 humain^{299,300}. Des observations similaires ont été réalisées pour un *Bunyaviridae*, le virus Hantaan et pour le virus Influenza A lui-même^{301,302}. L'ensemble de ces données rend séduisante, à ce niveau, l'hypothèse d'une interaction fonctionnelle entre la BoMX1 et la dynamine 2. Celle-ci n'est cependant pas démontrée. Au contraire, l'analyse des images en immunofluorescence indique une certaine co-localisation générale mais une distribution particulière clairement spécifique. De nombreux autres intervenants - dont certains ne sont peut-être pas encore identifiés à ce jour - jouent un rôle dans le mécanisme d'endocytose et constituent des cibles potentielles pour la protéine antivirale³⁰³. Sur cette approche

relative à la relation liant la résistance du pathogène à son mécanisme d'entrée, soulignons l'indifférence, à l'expression de la GTPase bovine, de virus dont le mode d'infection emploie une voie largement indépendante de l'endocytose. En effet, les virus de la famille des *Paramyxoviridae*, puisque c'est bien d'eux qu'il s'agit ici, pénètrent la cellule via une interaction directe avec la membrane cellulaire de leurs protéines F encore appelées « de fusion ».

Le rôle de la dynamine 2 ne se limite pas à la formation de la vésicule endosomale virale mais elle en contrôle également la distribution cellulaire. Ainsi, l'expression du mutant négatif K44A déjà mentionné inhibe clairement l'entrée des vRNPs dans le compartiment nucléaire de cellules infectées à une MOI élevée³⁰⁵.

La même technique du dominant négatif permet de démontrer que l'expression de GTPases de type Ras (Rab5 et Rab7) en altérant la fonction des endosomes primaires (« early endosome ») ou secondaires (« late endosome ») inhibe l'infection par le virus Influenza A. Ainsi, les mutants Rab5 S43N et Rab7 T22N inhibent la translocalisation nucléaire des vRNPs soulignant l'importance des deux compartiments pour l'infection par le virus Influenza A. Des expériences similaires ont montré que la réplication du VSV n'est inhibée que par l'expression des seuls mutants Rab5³⁰⁴.

L'interférence potentielle de BoMX1 avec certaines protéines qui n'appartiennent pas à la famille des GTPases mais qui possèdent une fonction définie dans le processus de tri des vésicules endosomales ne doit pas être négligée. Ainsi, les protéines VPS (*Vacuolar Protein Sorting*) de classe E (AAA ATPase) reconnaissent l'ubiquitine et interviennent dans le contrôle de l'endocytose. Elles s'associent pour former des oligomères et interagissent avec les membranes lipidiques. L'expression d'un mutant négatif (VSP4 E223Q) maintient les vRNPs du virus Influenza A entrant dans le compartiment cytoplasmique. Cet effet apparaît identique à celui observé par l'emploi de MG132, un inhibiteur du protéasome³⁰⁵. Remarquons que la machinerie VPS n'est pas requise pour l'infection de la cellule par le VSV.

Pour l'ensemble des expériences présentées ci-dessus et faisant appel à la technique des mutants négatifs, l'absence de défaut d'internalisation du virus a été démontrée, exception faite de celles faisant appel au mutant Rab5 S43N.

Au cours de la partie consacrée au mécanisme d'action de la MX1 bovine sur l'infection par le virus Influenza A, nous avons mis en évidence un phénomène d'inhibition décelable avant la transcription primaire. Le taux d'ARN viral entrant détecté au sein des cellules exprimant BoMX1 est clairement inférieur à celui des

cellules naïves. A ce stade, plusieurs possibilités non mutuellement exclusives existent : l'internalisation du virus se passe normalement mais le trafic des vésicules virales est altéré ; la formation de la vésicule est empêchée et le virion se détache sous l'action de la neuraminidase ; le nombre de récepteurs membranaires disponibles pour la fixation des virions est diminué par l'expression de BoMX1. Cette dernière hypothèse peut paraître quelque peu surprenante mais le transfert des glycoprotéines du réseau Golgi aux membranes est inhibé par les mutants dominants négatifs de la dynamine 2.

D'un point de vue expérimental, la perspective la plus enthousiasmante est sans aucun doute celle d'une analyse du trajet intra-cytoplasmique, par microscopie en temps réel, de virus Influenza A, marqués à l'aide d'une sonde fluorescente, au sein de cellules V103 induites ou non. Ce type d'approche devrait permettre l'identification d'une modification éventuelle d'une des étapes de l'endocytose virale par la BoMX1. Evidemment, les études plus classiques permettant d'analyser le parcours des vRNPs entrants apporteront également leur lot d'information avec la restriction imposée par les MOI extrêmement élevées qu'elles exigent, au-delà bien souvent de celles employées pour la mise en évidence par les techniques classiques des effets inhibiteurs de la réplication virale par la GTPase. Préalablement, une étude comparative du nombre de récepteurs sialiques exprimés par les cellules V103 en présence ou en absence de la protéine antivirale, constituera un objectif prioritaire.

En tout état de cause, les données apportées par ce travail mettent en évidence une action inhibitrice de la BoMX1 se manifestant dès les premiers moments de l'infection. De plus, elle oriente l'étude des mécanismes potentiels qui sous-tendent son activité antivirale vers des aspects indépendants *sensu stricto* de la structure moléculaire de l'agent infectieux mais déterminés par la biologie de son espèce et du mode d'interaction *lato sensu* hôte-pathogène.

Bibliographie

- ¹ Praefcke GJ, McMahon HT. The dynamin superfamily : universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004 Feb;5(2):133-47. Review.
- ² Niemann HH, Knetsch ML, Scherer A, Manstein DJ, Kull FJ. Crystal structure of a dynamin GTPase domain in both nucleotide-free and GDP-bound forms. *EMBO J.* 2001 Nov 1;20(21):5813-21.
- ³ Shaw G. The pleckstrin homology domain : an intriguing multifunctional protein module. *Bioassays.* 1996 Jan;18(1):35-46.
- ⁴ Mayer BJ, Ren R, Clark KL, Baltimore D. A putative modular domain present in diverse signaling proteins. *Cell.* 1993 May 21;73(4):629-30.
- ⁵ Zuchner S, Noureddine M, Kennerson M, Verhoeven K, Claeys K, De Jonghe P, Merory J, Oliveira SA, Speer MC, Stenger JE, Walizada G, Zhu D, Pericak-Vance MA, Nicholson G, Timmerman V, Vance JM. Mutations in the pleckstrin homology domain of dynamin 2 cause dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Genet.* 2005 Mar;37(3):215-6.
- ⁶ Harlan JE, Hajduk PJ, Yoon HS, Fesik SW. Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature.* 1994 Sep 8;371(6493):168-70.
- ⁷ Timm, D., Salim, K., Gout, I., Guruprasad, L., Waterfield, M., Blundell, T. Crystal structure of the pleckstrin homology domain from dynamin. *Nat.Struct.Biol.* v1, pp.782-788, 1994.
- ⁸ Ferguson KM, Lemmon MA, Schlessinger J, Sigler PB. Crystal structure at 2.2 Å resolution of the pleckstrin homology domain from human dynamin. *Cell.* 1994 Oct 21;79(2):199-209.
- ⁹ Muhlberg AB, Warnock DE, Schmid SL. Domain structure and intramolecular regulation of dynamin GTPase. *EMBO J.* 1997; 16: 6676-83.
- ¹⁰ Shupliakov O, Low P, Grabs D, Gad H, Chen H, David C, Takei K, De Camilli P, Brodin L. Synaptic vesicle endocytosis impaired by disruption of dynamin-SH3 domain interactions. *Science.* 1997, Apr. 11, 276 (5310) : 259-63.
- ¹¹ Lewitzky M, Harkiolaki M, Domart MC, Jones EY, Feller SM. Mona/Gads SH3C binding to hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1) combines an atypical SH3 binding motif, R/KXXXK, with a classical PXXP motif embedded in a polyproline type II (PPII) helix. *J Biol Chem.* 2004 Jul. 2, 279(27), 28724-32. Epub 2004 Apr 20.
- ¹² Van Dam EM, Stoorvogel W. Dynamin-dependent transferrin receptor recycling by endosome-derived clathrin-coated vesicles. *Mol Biol Cell.* 2002 Jan ; 13(1) :169-82.
- ¹³ Henley JR, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA. Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J Cell Biol.* 1998 Apr 6;141(1):85-99.
- ¹⁴ Oh P, McIntosh DP, Schnitzer JE. Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J Cell Biol.* 1998 Apr 6;141(1):101-14.
- ¹⁵ Gold ES, Underhill DM, Morrisette NS, Guo J, McNiven MA, Aderem A. Dynamin 2 is required for phagocytosis in macrophages. *J Exp Med.* 1999 Dec 20;190(12):1849-56.
- ¹⁶ Ochoa GC, Slepnev VI, Neff L, Ringstad N, Takei K, Daniell L, Kim W, Cao H, McNiven M, Baron R, De Camilli P. A functional link between dynamin and the actin cytoskeleton at podosomes. *J Cell Biol.* 2000 Jul 24;150(2):377-89.

-
- ¹⁷ Tr Konopka CA, Schleede JB, Skop AR, Bednarek SY. Traffic. Dynamin and cytokinesis. 2006 Mar;7(3):239-47.
- ¹⁸ Labrousse AM, Zappaterra MD, Rube DA, van der Bliet AM; C. elegans dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. Mol Cell. 1999 Nov;4(5):815-26.
- ¹⁹ Smirnova E, Shurland DL, Ryazantsev SN, van der Bliet AM. A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. J Cell Biol. 1998 Oct 19;143(2):351-8.
- ²⁰ Yoon Y, Pitts KR, McNiven MA. Mammalian dynamin-like protein DLP1 tubulates membranes. Mol Biol Cell. 2001 Sep;12(9):2894-905.
- ²¹ Koch A, Yoon Y, Bonekamp NA, McNiven MA, Schrader M. A role for Fis1 in both mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. Mol Biol Cell. 2005 Nov;16(11):5077-86. 2005 Aug 17.
- ²² Schrader M. Shared components of mitochondrial and peroxisomal division. Biochim Biophys Acta. 2006 May-Jun;1763(5-6):531-41. 2006 Feb 2.
- ²³ Chanez AL, Hehl AB, Engstler M, Schneider A. Ablation of the single dynamin of T. brucei blocks mitochondrial fission and endocytosis and leads to a precise cytokinesis arrest. J Cell Sci. 2006 Jul 15;119(Pt 14):2968-74. 2006 Jun 20.
- ²⁴ Misaka T, Murate M, Fujimoto K, Kubo Y. The dynamin-related mouse mitochondrial GTPase OPA1 alters the structure of the mitochondrial inner membrane when exogenously introduced into COS-7 cells. Neurosci Res. 2006 Jun;55(2):123-33. 2006 Apr 5.
- ²⁵ Griffin EE, Chan DC. Domain interactions within Fzo1 oligomers are essential for mitochondrial fusion. J Biol Chem. 2006 Jun 16;281(24):16599-606. 2006 Apr 19.
- ²⁶ Pavlovic J, Schroder A, Blank A, Pitossi F, Staeheli P. Mx proteins : GTPases involved in the interferon-induced antiviral state. Ciba Found Symp. 1993;176:233-43.
- ²⁷ Zhu PP, Patterson A, Lavoie B, Stadler J, Shoeb M, Patel R, Blackstone C.J. Cellular localization, oligomerization, and membrane association of the hereditary spastic paraplegia 3A (SPG3A) protein atlastin. Biol Chem. 2003 Dec 5;278(49):49063-71. 2003 Sep 23.
- ²⁸ Sauter SM, Engel W, Neumann LM, Kunze J, Neesen J. Novel mutations in the Atlastin gene (SPG3A) in families with autosomal dominant hereditary spastic paraplegia and evidence for late onset forms of HSP linked to the SPG3A locus. Hum Mutat. 2004 Jan., 23(1) : 98.
- ²⁹ Anderson SL, Carton JM, Lou J, Xing L, Rubin BY. Interferon-induced guanylate binding protein-1 (GBP-1) mediates an antiviral effect against vesicular stomatitis virus and encephalomyocarditis virus. Virology. 1999 Mar 30;256(1):8-14.
- ³⁰ Carter CC, Gorbacheva VY, Vestal DJ. Inhibition of VSV and EMCV replication by the interferon-induced GTPase, mGBP-2: differential requirement for wild-type GTP binding domain. Arch Virol. 2005 Jun;150(6):1213-20. 2005 Feb 18.
- ³¹ Prakash B, Renault L, Praefcke GJ, Herrmann C, Wittinghofer A. Triphosphate structure of guanylate-binding protein 1 and implications for nucleotide binding and GTPase mechanism. EMBO J. 2000 Sep 1;19(17):4555-64.
- ³² Lindenmann J. From interference to interferon: a brief historical introduction. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1982 Sep 24;299(1094) : 3-6.
- ³³ Doly J, Civas A, Navarro S, Uze G. Type I interferons: expression and signalization Cell Mol Life Sci. 1998 Oct;54(10):1109-21.

- ³⁴ De Maeyer E, De Maeyer-Guignard J. Type I interferons. *Int Rev Immunol.* 1998;17(1-4):53-73. Review.
- ³⁵ Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev.* 2004 Dec;202:8-32. Review.
- ³⁶ Allen G, Diaz MO. Nomenclature of the human interferon proteins. *J Interferon Cytokine Res.* 1996 Feb;16(2):181-4.
- ³⁷ Bazer FW, Spencer TE. Methods for studying interferon tau stimulated genes. *Methods Mol Med.* 2006;122:367-80.
- ³⁸ Finbloom DS, Hoover DL, Wahl LM. The characteristics of binding of human recombinant interferon-gamma to its receptor on human monocytes and human monocyte-like cell lines. *J Immunol.* 1985 Jul;135(1):300-5.
- ³⁹ Imam AM, Ackrill AM, Dale TC, Kerr IM, Stark GR. Transcription factors induced by interferons alpha and gamma. *Nucleic Acids Res.* 1990 Nov 25;18(22):6573-80.
- ⁴⁰ Decker T, Lew DJ, Mirkovitch J, Darnell JE Jr. Cytoplasmic activation of GAF, an IFN-gamma-regulated DNA-binding factor. *EMBO J.* 1991 Apr;10(4):927-32.
- ⁴¹ Sanda C, Weitzel P, Tsukahara T, Schaley J, Edenberg HJ, Stephens MA, McClintick JN, Blatt LM, Li L, Brodsky L, Taylor MW. Differential gene induction by type I and type II interferons and their combination. *J Interferon Cytokine Res.* 2006 Jul;26(7):462-72.
- ⁴² U. Boehm, -T. Klamp, -M. Groot, and -J. C. Howard. Cellular responses to interferon- γ . *Annual Review of Immunology.* Vol. 15: 749-795
- ⁴³ Sato A, Ohtsuki M, Hata M, Kobayashi E, Murakami T. Antitumor activity of IFN-lambda in murine tumor models. *J Immunol.* 2006 Jun 15;176(12):7686-94.
- ⁴⁴ Ank N, West H, Bartholdy C, Eriksson K, Thomsen AR, Paludan SR. Lambda interferon (IFN-lambda), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo. *J Virol.* 2006 May;80(9):4501-9.
- ⁴⁵ Owerbach D, Rutter WJ, Shows TB, Gray P, Goeddel DV, Lawn RM. Leukocyte and fibroblast interferon genes are located on human chromosome 9. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 May;78(5):3123-7.
- ⁴⁶ Ohno S, Taniguchi T. Structure of a chromosomal gene for human interferon beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Sep;78(9):5305-5309.
- ⁴⁷ Houghton M, Jackson IJ, Porter AG, Doel SM, Catlin GH, Barber C, Carey NH. The absence of introns within a human fibroblast interferon gene. *Nucleic Acids Res.* 1981 Jan 24;9(2):247-66.
- ⁴⁸ Van Pesch V, Lanaya H, Renauld JC, Michiels T. Characterization of the murine alpha interferon gene family. *J Virol.* 2004 Aug;78(15):8219-28.
- ⁴⁹ Chen J, Baig E, Fish EN. Diversity and relatedness among the type I interferons. *J Interferon Cytokine Res.* 2004 Dec;24(12):687-98.
- ⁵⁰ Vodjdani G, Coulombel C, Doly J. Structure and characterization of a murine chromosomal fragment containing the interferon beta gene. *J Mol Biol.* 1988 Nov 20;204(2):221-31.
- ⁵¹ Capon DJ, Shepard HM, Goeddel DV. Two distinct families of human and bovine interferon-alpha genes are coordinately expressed and encode functional polypeptides. *Mol Cell Biol.* 1985 April; 5(4): 768-779.
- ⁵² Utsumi J, Mizuno Y, Hosoi K, Okano K, Sawada R, Kajitani M, Sakai I, Naruto M, Shimizu H. Characterization of four different mammalian-cell-derived recombinant human interferon-beta.

Identical polypeptides and non-identical carbohydrate moieties compared to natural ones. *Eur J Biochem.* 1989 May 15;181(3):545-53.

⁵³ Mizrahi A, O'Malley JA, Carter WA, Takatsuki A, Tamura G, Sulkowski E. Glycosylation of interferons. Effects of tunicamycin on human immune interferon. *J Biol Chem.* 1978 Nov 10;253(21):7612-5.

⁵⁴ Radhakrishnan R, Walter LJ, Hruza A, Reichert P, Trotta PP, Nagabhushan TL, Walter MR. Zinc mediated dimer of human interferon-alpha 2b revealed by X-ray crystallography. *Structure.* 1996 Dec 15;4(12):1453-63.

⁵⁵ Mamane Y, Heylbroeck C, Genin P, Algarte M, Servant MJ, LePage C, DeLuca C, Kwon H, Lin R, Hiscott J. Interferon regulatory factors: the next generation. *Gene.* 1999 Sep 3;237(1):1-14.

⁵⁶ Nguyen H, Hiscott J, Pitha PM. The growing family of interferon regulatory factors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1997 Dec;8(4):293-312.

⁵⁷ Panne D, Maniatis T, Harrison SC. Crystal structure of ATF-2/c-Jun and IRF-3 bound to the interferon-beta enhancer. *EMBO J.* 2004 Nov 10;23(22):4384-93 Oct 28.

⁵⁸ Taniguchi T, Takaoka A. The interferon-alpha/beta system in antiviral responses : a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Curr Opin Immunol.* 2002 Feb;14(1):111-6.

⁵⁹ Genin P, Braganca J, Darracq N, Doly J, Civas A. A novel PRD I and TG binding activity involved in virus-induced transcription of IFN-A genes. *Nucleic Acids Res.* 1995 Dec 25;23(24):5055-63.

⁶⁰ Morin P, Braganca J, Bandu MT, Lin R, Hiscott J, Doly J, Civas. Preferential binding sites for interferon regulatory factors 3 and 7 involved in interferon-A gene transcription. *AJ Mol Biol.* 2002 Mar 8;316(5):1009-22

⁶¹ Honda K, Yanai H, Takaoka A, Taniguchi T. Regulation of the type I IFN induction: a current view. *Int Immunol.* 2005 Nov;17(11):1367-78. Epub 2005 Oct 7. Review.

⁶² Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol.* 2004 Jul;5(7):730-7. Epub 2004 Jun 20.

⁶³ Balachandran S, Thomas E, Barber GN. A FADD-dependent innate immune mechanism in mammalian cells. *Nature.* 2004 Nov 18;432(7015):401-5.

⁶⁴ Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, Coyle AJ, Liao SM, Maniatis T. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol.* 2003 May;4(5):491-6.

⁶⁵ Sharma S, tenOever BR, Grandvaux N, Zhou GP, Lin R, Hiscott J. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science.* 2003 May 16;300(5622):1148-51. Epub 2003 Apr 17.

⁶⁶ Marie I, Durbin JE, Levy DE. Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *EMBO J.* 1998 Nov 16;17(22):6660-9.

⁶⁷ Biron CA. Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN-alpha/beta), in innate and adaptive immune responses to viral infections. *Semin Immunol.* 1998 Oct;10(5):383-90. Review.

⁶⁸ Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, Iwasaki A, Flavell RA. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *PNAS* April 13, 2004 vol. 101 no. 15

- ⁶⁹ Takeda K, Akira S. Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. *Genes Cells*. 2001 Sep;6(9):733-42. Review.
- ⁷⁰ Guillot L, Le Goffic R, Bloch S, Escriou N, Akira S, Chignard M, Si-Tahar. Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. *M J Biol Chem*. 2005 Feb 18;280(7):5571-80. 2004 Dec 3.
- ⁷¹ Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001 Oct 18;413(6857):732-8.
- ⁷² Jiang Z, Zamanian-Daryoush M, Nie H, Silva AM, Williams BR, Li X. Poly(I-C)-induced Toll-like receptor 3 (TLR3)-mediated activation of NFkappa B and MAP kinase is through an interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK)-independent pathway employing the signaling components TLR3-TRAF6-TAK1-TAB2-PKR. *J Biol Chem*. 2003 May 9;278(19):16713-9. Epub 2003 Feb 27. Erratum in: *J Biol Chem*. 2003 Jun 20;278(5):23212.
- ⁷³ Rassa JC, Meyers JL, Zhang Y, Kudaravalli R, Ross SR. Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Feb 19;99(4):2281-6.
- ⁷⁴ Haynes LM, Moore DD, Kurt-Jones EA, Finberg RW, Anderson LJ, Tripp RA. Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus. *J Virol*. 2001 Nov;75(22):10730-7.
- ⁷⁵ Lien E, Means TK, Heine H, Yoshimura A, Kusumoto S, Fukase K, Fenton MJ, Oikawa M, Qureshi N, Monks B, Finberg RW, Ingalls RR, Golenbock DT. Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J Clin Invest*. 2000 Feb;105(4):497-504.
- ⁷⁶ Beutler B. TLR4 as the mammalian endotoxin sensor. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2002;270:109-20.
- ⁷⁷ Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*. 2003 Aug 1;301(5633):640-3.
- ⁷⁸ Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol*. 2003 Nov;4(11):1144-50.
- ⁷⁹ Hoshino K, Kaisho T, Iwabe T, Takeuchi O, Akira S. Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation. *Int Immunol*. 2002 Oct;14(10):1225-31.
- ⁸⁰ Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, Caffrey DR, Visintin A, Latz E, Monks B, Pitha PM, Golenbock DT. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med*. 2003 Oct 6;198(7):1043-55. Epub 2003 Sep 29. Erratum in: *J Exp Med*. 2003 Nov 3;198(9):following 1450.
- ⁸¹ Doyle S, Vaidya S, O'Connell R, Dadgostar H, Dempsey P, Wu T, Rao G, Sun R, Haberland M, Modlin R, Cheng G. IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity*. 2002 Sep;17(3):251-63.
- ⁸² Wagner H. The immunobiology of the TLR9 subfamily. *Trends Immunol*. 2004 Jul;25(7):381-6.
- ⁸³ Krug A, Luker GD, Barchet W, Leib DA, Akira S, Colonna M. Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood*. 2004 Feb 15;103(4):1433-7.
- ⁸⁴ Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med*. 2003 Aug 4;198(3):513-20.
- ⁸⁵ Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*. 2004 Mar 5;303(5663):1529-31.

- ⁸⁶ Hemmi H., Kaisho T., Takeda K., Akira S. The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets. *J Immunol.* 2003 Mar 15;170(6):3059-64.
- ⁸⁷ Honda K, Yanai H, Mizutani T, Negishi H, Shimada N, Suzuki N, Ohba Y, Takaoka A, Yeh WC, Taniguchi T. Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Oct 26;101(43):15416-21.
- ⁸⁸ Tsukahara T, Kim S, Taylor MW. Refinement : a search framework for the identification of interferon-responsive elements in DNA sequences--a case study with ISRE and GAS. *Comput Biol Chem.* 2006 Apr;30(2):134-47. Epub 2006 Mar 20.
- ⁸⁹ Geiss GK, Carter VS, He Y, Kwieciszewski BK, Holzman T, Korth MJ, Lazaro CA, Fausto N, Bumgarner RE, Katze MG. Gene expression profiling of the cellular transcriptional network regulated by alpha/beta interferon and its partial attenuation by the hepatitis C virus nonstructural 5A protein. *J Virol.* 2003 Jun;77(11):6367-75.
- ⁹⁰ Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev.* 2001 Oct;14(4):778-809.
- ⁹¹ Lemaire PA, Lary J, Cole JL. Mechanism of PKR activation: dimerization and kinase activation in the absence of double-stranded RNA. *J Mol Biol.* 2005 Jan 7;345(1):81-90.
- ⁹² Gale M Jr, Tan SL, Katze MG. Translational control of viral gene expression in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000 Jun;64(2):239-80.
- ⁹³ Smith JA, Schmechel SC, Williams BR, Silverman RH, Schiff LA. Involvement of the interferon-regulated antiviral proteins PKR and RNase L in reovirus-induced shutoff of cellular translation. *J Virol.* 2005 Feb;79(4):2240-50.
- ⁹⁴ Samuel MA, Whitby K, Keller BC, Marri A, Barchet W, Williams R, Silverman RH, Gale M Jr, Diamond MS. PKR and RNase L contribute to protection against lethal West Nile Virus infection by controlling early viral spread in the periphery and replication in neurons. *J Virol.* 2006 Jul;80(14):7009-19.
- ⁹⁵ Baltzis D, Qu LK, Papadopoulou S, Blais JD, Bell JC, Sonenberg N, Koromilas AE. Resistance to vesicular stomatitis virus infection requires a functional cross talk between the eukaryotic translation initiation factor 2alpha kinases PERK and PKR. *J Virol.* 2004 Dec;78(23):12747-61.
- ⁹⁶ Khabar KS, Dhalla M, Siddiqui Y, Zhou A, Al-Ahdal MN, Der SD, Silverman RH, Williams BRJ. Effect of deficiency of the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR, on antiviral resistance in the presence or absence of ribonuclease L: HSV-1 replication is particularly sensitive to deficiency of the major IFN-mediated enzymes. *Interferon Cytokine Res.* 2000 Jul;20(7):653-9.
- ⁹⁷ Chinsangaram J, Koster M, Grubman MJ. Inhibition of L-deleted foot-and-mouth disease virus replication by alpha/beta interferon involves double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J Virol.* 2001 Jun;75(12):5498-503.
- ⁹⁸ Rivas-Estilla AM, Svitkin Y, Lopez Lastra M, Hatzoglou M, Sherker A, Koromilas AE. PKR-dependent mechanisms of gene expression from a subgenomic hepatitis C virus clone. *J Virol.* 2002 Nov;76(21):10637-53.
- ⁹⁹ Hovnanian A, Rebouillat D, Mattei MG, Levy ER, Marie I, Monaco AP, Hovanessian AG. The human 2',5'-oligoadenylate synthetase locus is composed of three distinct genes clustered on chromosome 12q24.2 encoding the 100-, 69-, and 40-kDa forms. *Genomics.* 1998 Sep 15;52(3):267-77.
- ¹⁰⁰ Dong B, Silverman RH. 2-5A-dependent RNase molecules dimerize during activation by 2-5A. *J Biol Chem.* 1995 Feb 24;270(8):4133-7.

- ¹⁰¹ Li XL, Blackford JA, Hassel BA. RNase L mediates the antiviral effect of interferon through a selective reduction in viral RNA during encephalomyocarditis virus infection. *J Virol.* 1998 Apr;72(4):2752-9.
- ¹⁰² Espert L, Rey C, Gonzalez L, Degols G, Chelbi-Alix MK, Mehti N, Gongora C. The exonuclease ISG20 is directly induced by synthetic dsRNA via NF-kappaB and IRF1 activation. *Oncogene.* 2004 Jun 3;23(26):4636-40
- ¹⁰³ Gongora, C., David, G., Pintard, L., Tissot, C., Hua, T. D., Dejean, A., and Mehti, N. Molecular cloning of a new interferon-induced PML nuclear body-associated protein. *J. Biol. Chem.* (1997). 272, 19457-19463.
- ¹⁰⁴ Espert L, Degols G, Gongora C, Blondel D, Williams BR, Silverman RH, Mehti N ISG20, a new interferon-induced RNase specific for single-stranded RNA, defines an alternative antiviral pathway against RNA genomic viruses. *J Biol Chem.* 2003 May 2;278(18):16151-8.
- ¹⁰⁵ Schul, W., van Der Kraan, I., Matera, A.G., van Driel, R. and de Jong, L. (1999) Nuclear domains enriched in RNA 3'-processing factors associate with coiled bodies and histone genes in a cell cycle-dependent manner. *Mol Biol Cell*, 10, 3815-3824.
- ¹⁰⁶ Espert L, Eldin P, Gongora C, Bayard B, Harper F, Chelbi-Alix MK, Bertrand E, Degols G, Mehti N. The exonuclease ISG20 mainly localizes in the nucleolus and the Cajal (Coiled) bodies and is associated with nuclear SMN protein-containing complexes. *J Cell Biochem.* 2006 Aug 1;98(5):1320-33.
- ¹⁰⁷ Desterro JM, Keegan LP, Lafarga M, Berciano MT, O'Connell M, Carmo-Fonseca M. Dynamic association of RNA-editing enzymes with the nucleolus. *J Cell Sci.* 2003 May 1;116(Pt 9):1805-18.
- ¹⁰⁸ Keegan, L. P., Gallo, A. and O'Connell, M. AThe many roles of an RNA editor. *Nat. Rev. Genet.* (2001). 2,869 –878.
- ¹⁰⁹ Taylor, J. M. Hepatitis delta virus: cis and trans functions required for replication. *Cell.* (1990). 61,371 –373.
- ¹¹⁰ Scadden, A. D. and Smith, C. W. Specific cleavage of hyper-edited dsRNAs. *EMBO J.* (2001) 20,4243 –4252.
- ¹¹¹ Haller O, Frese M, Kochs G. Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses. *Rev Sci Tech.* 1998 Apr;17(1):220-30.
- ¹¹² Bernasconi D, Schultz U, Staeheli P. The interferon-induced Mx protein of chickens lacks antiviral activity. *J Interferon Cytokine Res.* 1995 Jan;15(1):47-53.
- ¹¹³ Jensen V, Robertsen B. Cloning of an Mx cDNA from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) and characterization of Mx mRNA expression in response to double-stranded RNA or infectious pancreatic necrosis virus. *J Interferon Cytokine Res.* 2000 Aug;20(8):701-10.
- ¹¹⁴ Horisberger MA, Gunst MC. Interferon-induced proteins: identification of Mx proteins in various mammalian species. *Virology.* 1991 Jan;180(1):185-90.
- ¹¹⁵ Aebi M, Fah J, Hurt N, Samuel CE, Thomis D, Bazzigher L, Pavlovic J, Haller O, Staeheli P. cDNA structures and regulation of two interferon-induced human Mx proteins. *Mol Cell Biol.* 1989 Nov ; 9(11):5062-72.
- ¹¹⁶ Meier E, Kunz G, Haller O, Arnheiter H. Activity of rat Mx proteins against a rhabdovirus. *J Virol.* 1990 Dec ; 64(12):6263-9.
- ¹¹⁷ Trobridge GD, Chiou PP, Leong JA. Cloning of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx2 and Mx3 cDNAs and characterization of trout Mx protein expression in salmon cells. *J Virol.* 1997 Jul ; 71(7) : 5304-11.

- ¹¹⁸ Kochs G, Haener M, Aebi U, Haller O. Self-assembly of human MxA GTPase into highly ordered dynamin-like oligomers. *J Biol Chem.* 2002 Apr 19;277(16) : 14172-6.
- ¹¹⁹ Pavlovic J, Schroder A, Blank A, Pitossi F, Staeheli P. Mx proteins: GTPases involved in the interferon-induced antiviral state. *Ciba Found Symp.* 1993;176:233-43; discussion 243-7.
- ¹²⁰ Kochs G, Haller O. Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of *Thogoto virus* nucleocapsids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 2;96(5):2082-6.
- ¹²¹ Kochs G, Haener M, Aebi U, Haller O. Self-assembly of human MxA GTPase into highly ordered dynamin-like oligomers. *J Biol Chem.* 2002 Apr 19;277(16):14172-6.
- ¹²² Lindenmann J. Resistance of mice to mouse-adapted influenza A virus. *Virology.* 1962 Feb;16:203-4.
- ¹²³ Lindenmann J, Lane Ca, Hobson D. The resistance of A2G mice to myxoviruses. *J Immunol.* 1963 Jun;90:942-51.
- ¹²⁴ Lindenmann J. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1964 Jun;116:506-9. Inheritance of resistance to Influenza virus in mice.
- ¹²⁵ Haller O, Acklin M, Staeheli P. Influenza virus resistance of wild mice: wild-type and mutant Mx alleles occur at comparable frequencies. *J Interferon Res.* 1987 Oct;7(5):647-56.
- ¹²⁶ Haller O, Arnheiter H, Lindenmann J. Genetically determined resistance to infection by hepatotropic influenza A virus in mice: effect of immunosuppression. *J. Infect Immun.* 1976 Mar;13(3):844-54.
- ¹²⁷ Fiske RA, Klein PA. Effect of immunosuppression on the genetic resistance of A2G mice to neurovirulent influenza virus. *Infect Immun.* 1975 Mar;11(3):576-87.
- ¹²⁸ Staeheli P, Horisberger MA, Haller O. Mx-dependent resistance to influenza viruses is induced by mouse interferons alpha and beta but not gamma. *Virology.* 1984 Jan 30;132(2):456-61.
- ¹²⁹ Haller O, Arnheiter H, Gresser I, Lindenmann J. Genetically determined, interferon-dependent resistance to influenza virus in mice. *J Exp Med.* 1979 Mar 1;149(3):601-12.
- ¹³⁰ Horisberger MA, Staeheli P, Haller O. Interferon induces a unique protein in mouse cells bearing a gene for resistance to influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 Apr;80(7):1910-4.
- ¹³¹ Horisberger MA. Interferon-induced human protein MxA is a GTPase which binds transiently to cellular proteins. *J Virol.* 1992 Aug;66(8):4705-9.
- ¹³² Staeheli P, Danielson P, Haller O, Sutcliffe JG. Transcriptional activation of the mouse Mx gene by type I interferon. *Mol Cell Biol.* 1986 Dec;6(12):4770-4.
- ¹³³ Aebi M, Fah J, Hurt N, Samuel CE, Thomis D, Bazzigher L, Pavlovic J, Haller O, Staeheli P. cDNA structures and regulation of two interferon-induced human Mx proteins. *Mol Cell Biol.* 1989 Nov;9(11):5062-72.
- ¹³⁴ Horisberger MA, Hochkeppel HK. IFN-alpha induced human 78 kD protein: purification and homologies with the mouse Mx protein, production of monoclonal antibodies, and potentiation effect of IFN-gamma. *J Interferon Res.* 1987 Aug;7(4):331-43.
- ¹³⁵ Goetschy JF, Zeller H, Content J, Horisberger MA. Regulation of the interferon-inducible IFI-78K gene, the human equivalent of the murine Mx gene, by interferons, double-stranded RNA, certain cytokines, and viruses. *J Virol.* 1989 Jun;63(6):2616-22.
- ¹³⁶ Staeheli P, Danielson P, Haller O, Sutcliffe JG. Transcriptional activation of the mouse Mx gene by type I interferon. *Mol Cell Biol.* 1986 Dec;6(12):4770-4.

- ¹³⁷ Ronni T, Melen K, Malygin A, Julkunen I. Control of IFN-inducible MxA gene expression in human cells. *J Immunol.* 1993 Mar 1;150(5):1715-26.
- ¹³⁸ Ronni T, Sareneva T, Pirhonen J, Julkunen I. Activation of IFN-alpha, IFN-gamma, MxA, and IFN regulatory factor 1 genes in influenza A virus-infected human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol.* 1995 Mar 15;154(6):2764-74.
- ¹³⁹ Yap WH, Tay A, Brenner S, Venkatesh B. Molecular cloning of the pufferfish (*Takifugu rubripes*) Mx gene and functional characterization of its promoter. *Immunogenetics.* 2003 Jan;54(10):705-13. Epub 2003 Jan 9.
- ¹⁴⁰ Altmann SM, Mellon MT, Johnson MC, Paw BH, Trede NS, Zon LI, Kim CH. Cloning and characterization of an Mx gene and its corresponding promoter from the zebrafish, *Danio rerio*. *Dev Comp Immunol.* 2004 Apr;28(4):295-306.
- ¹⁴¹ Hug H, Costas M, Staeheli P, Aebi M, Weissmann C. Organization of the murine Mx gene and characterization of its interferon- and virus-inducible promoter. *Mol Cell Biol.* 1988 Aug;8(8):3065-79.
- ¹⁴² Schumacher B, Bernasconi D, Schultz U, Staeheli P. The chicken Mx promoter contains an ISRE motif and confers interferon inducibility to a reporter gene in chick and monkey cells. *Virology.* 1994 Aug 15;203(1):144-8.
- ¹⁴³ Gerardin JA, Baise EA, Pire GA, Leroy MP, Desmecht DJ. Genomic structure, organisation, and promoter analysis of the bovine (*Bos taurus*) Mx1 gene. *Gene.* 2004 Feb 4;326:67-75.
- ¹⁴⁴ Thomas AV, Palm M, Broers AD, Zezafoon H, Desmecht DJ. Immunogenetics. Genomic structure, promoter analysis, and expression of the porcine (*Sus scrofa*) Mx1 gene. 2006 Jun;58(5-6):383-9. Epub 2006 Apr 26.
- ¹⁴⁵ Asano A, Jin HK, Watanabe T. Mouse Mx2 gene: organization, mRNA expression and the role of the interferon-response promoter in its regulation. *Gene.* 2003 Mar 13;306:105-13.
- ¹⁴⁶ Ronni T, Matikainen S, Lehtonen A, Palvimo J, Dellis J, Van Eylen F, Goetschy JF, Horisberger M, Content J, Julkunen I. The proximal interferon-stimulated response elements are essential for interferon responsiveness : a promoter analysis of the antiviral MxA gene. *J Interferon Cytokine Res.* 1998 Sep;18(9):773-81.
- ¹⁴⁷ Horvath CM. The Jak-STAT pathway stimulated by interferon alpha or interferon beta. *Sci STKE.* 2004 Nov 23;2004(260):tr10.
- ¹⁴⁸ Gauzzi MC, Velazquez L, McKendry R, Mogensen KE, Fellous M, Pellegrini S. Interferon-alpha-dependent activation of Tyk2 requires phosphorylation of positive regulatory tyrosines by another kinase. *J Biol Chem.* 1996 Aug 23;271(34):20494-500.
- ¹⁴⁹ Colamonici OR, Uyttendaele H, Domanski P, Yan H, Krolewski JJ. p135tyk2, an interferon-alpha-activated tyrosine kinase, is physically associated with an interferon-alpha receptor. *J Biol Chem.* 1994 Feb 4;269(5):3518-22.
- ¹⁵⁰ Li X, Leung S, Qureshi S, Darnell JE Jr, Stark GR. Formation of STAT1-STAT2 heterodimers and their role in the activation of IRF-1 gene transcription by interferon-alpha. *J Biol Chem.* 1996 Mar 8;271(10):5790-4.
- ¹⁵¹ Grumbach IM, Fish EN, Uddin S, Majchrzak B, Colamonici OR, Figulla HR, Heim A, Plataniias LC. Activation of the Jak-Stat pathway in cells that exhibit selective sensitivity to the antiviral effects of IFN-beta compared with IFN-alpha. *J Interferon Cytokine Res.* 1999 Jul;19(7):797-801.
- ¹⁵² Zurcher T, Pavlovic J, Staeheli P. Nuclear localization of mouse Mx1 protein is necessary for inhibition of influenza virus. *J Virol.* 1992 Aug;66(8):5059-66.

- ¹⁵³ Meier E, Kunz G, Haller O, Arnheiter H. Activity of rat Mx proteins against a Rhabdovirus. *J Virol.* 1990 Dec;64(12):6263-9.
- ¹⁵⁴ Horisberger MA, Gunst MC. Interferon-induced proteins: identification of Mx proteins in various mammalian species. *Virology.* 1991 Jan;180(1):185-90.
- ¹⁵⁵ Melen K, Keskinen P, Ronni T, Sareneva T, Lounatmaa K, Julkunen I. Human MxB protein, an interferon-alpha-inducible GTPase, contains a nuclear targeting signal and is localized in the heterochromatin region beneath the nuclear envelope. *J Biol Chem.* 1996 Sep 20;271(38):23478-86.
- ¹⁵⁶ Melen K, Julkunen I. Nuclear cotransport mechanism of cytoplasmic human MxB protein. *J Biol Chem.* 1997 Dec 19;272(51):32353-9.
- ¹⁵⁷ Reichelt M, Stertz S, Krijnse-Locker J, Haller O, Kochs G. Missorting of La Crosse virus nucleocapsid protein by the interferon-induced MxA GTPase involves smooth ER. *Membranes Traffic.* 2004 Oct;5(10):772-84.
- ¹⁵⁸ Accola MA, Huang B, Al Masri A, McNiven MA. The antiviral dynamin family member, MxA, tubulates lipids and localizes to the smooth endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 2002 Jun 14;277(24):21829-35.
- ¹⁵⁹ Engelhardt OG, Sirma H, Pandolfi PP, Haller O. Mx1 GTPase accumulates in distinct nuclear domains and inhibits influenza A virus in cells that lack promyelocytic leukaemia protein nuclear bodies. *J Gen Virol.* 2004 Aug;85(Pt 8):2315-26.
- ¹⁶⁰ Nakayama M, Nagata K, Kato A, Ishihama A. Interferon-inducible mouse Mx1 protein that confers resistance to influenza virus is GTPase. *J Biol Chem.* 1991 Nov 15;266(32):21404-8.
- ¹⁶¹ Melen K, Ronni T, Lotta T, Julkunen I. Enzymatic characterization of interferon-induced antiviral GTPases murine Mx1 and human MxA proteins. *J Biol Chem.* 1994 Jan 21;269(3):2009-15.
- ¹⁶² Nakayama M, Yazaki K, Kusano A, Nagata K, Hanai N, Ishihama A. Structure of mouse Mx1 protein. Molecular assembly and GTP-dependent conformational change. *J Biol Chem.* 1993 Jul 15;268(20):15033-8.
- ¹⁶³ Chugh J, Chatterjee A, Kumar A, Mishra RK, Mittal R, Hosur RV. Structural characterization of the large soluble oligomers of the GTPase effector domain of dynamin. *FEBS J.* 2006 Jan;273(2):388-97.
- ¹⁶⁴ Ponten A, Sick C, Weeber M, Haller O, Kochs G. Dominant-negative mutants of human MxA protein: domains in the carboxy-terminal moiety are important for oligomerization and antiviral activity. *J Virol.* 1997 Apr;71(4):2591-9.
- ¹⁶⁵ Melen K, Ronni T, Broni B, Krug RM, von Bonsdorff CH, Julkunen I. Interferon-induced Mx proteins form oligomers and contain a putative leucine zipper. *J Biol Chem.* 1992 Dec 25;267(36):25898-907.
- ¹⁶⁶ Schumacher B, Staeheli P. Domains mediating intramolecular folding and oligomerization of MxA GTPase. *J Biol Chem.* 1998 Oct 23;273(43):28365-70.
- ¹⁶⁷ Melen K, Ronni T, Lotta T, Julkunen I. Enzymatic characterization of interferon-induced antiviral GTPases murine Mx1 and human MxA proteins. *J Biol Chem.* 1994 Jan 21;269(3):2009-15.
- ¹⁶⁸ Garber EA, Hreniuk DL, Scheidel LM, van der Ploeg LH. Mutations in murine Mx1: effects on localization and antiviral activity. *Virology.* 1993 Jun;194(2):715-23.
- ¹⁶⁹ Melen K, Julkunen I. Mutational analysis of murine Mx1 protein: GTP binding core domain is essential for anti-influenza A activity. *Virology.* 1994. Nov 15;205(1):269-79.
- ¹⁷⁰ Pavlovic J, Schroder A, Blank A, Pitossi F, Staeheli P. Mx proteins: GTPases involved in the interferon-induced antiviral state. *Ciba Found Symp.* 1993;176:233-43; discussion 243-7.

- ¹⁷¹ Schwemmler M, Richter MF, Herrmann C, Nassar N, Staeheli P. Unexpected structural requirements for GTPase activity of the interferon-induced MxA protein. *J Biol Chem*. 1995 Jun 2;270(22):13518-23.
- ¹⁷² Janzen C, Kochs G, Haller O. A monomeric GTPase-negative MxA mutant with antiviral activity. *J Virol*. 2000 Sep;74(17):8202-6.
- ¹⁷³ Ponten A, Sick C, Weeber M, Haller O, Kochs G. Dominant-negative mutants of human MxA protein: domains in the carboxy-terminal moiety are important for oligomerization and antiviral activity. *J Virol*. 1997 Apr;71(4):2591-9.
- ¹⁷⁴ Flohr F, Schneider-Schaulies S, Haller O, Kochs G. The central interactive region of human MxA GTPase is involved in GTPase activation and interaction with viral target structures. *GFEBS Lett*. 1999 Dec 10;463(1-2):24-8.
- ¹⁷⁵ Kochs G, Haller O. Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of *Thogoto virus* nucleocapsids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Mar 2;96(5):2082-6.
- ¹⁷⁶ Ponten A, Sick C, Weeber M, Haller O, Kochs G. Dominant-negative mutants of human MxA protein: domains in the carboxy-terminal moiety are important for oligomerization and antiviral activity. *J Virol*. 1997 Apr;71(4):2591-9.
- ¹⁷⁷ Zurcher T, Pavlovic J, Staeheli P. Mechanism of human MxA protein action: variants with changed antiviral properties. *EMBO J*. 1992 Apr;11(4):1657-61.
- ¹⁷⁸ Kochs G, Janzen C, Hohenberg H, Haller O. Antivirally active MxA protein sequesters La Crosse virus nucleocapsid protein into perinuclear complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Mar 5;99(5):3153-8.
- ¹⁷⁹ Johannes L, Kambadur R, Lee-Hellmich H, Hodgkinson CA, Arnheiter H, Meier E.J. Antiviral determinants of rat Mx GTPases map to the carboxy-terminal half. *Virol*. 1997 Dec;71(12):9792-5.
- ¹⁸⁰ Ko JH, Jin HK, Asano A, Takada A, Ninomiya A, Kida H, Hokiya H, Ohara M, Tsuzuki M, Nishibori M, Mizutani M, Watanabe T. Polymorphisms and the differential antiviral activity of the chicken Mx gene. *Genome Res*. 2002 Apr;12(4):595-601.
- ¹⁸¹ Seyama T, Ko JH, Ohe M, Sasaoka N, Okada A, Gomi H, Yoneda A, Ueda J, Nishibori M, Okamoto S, Maeda Y, Watanabe T. Population Research of Genetic Polymorphism at Amino Acid Position 631 in Chicken Mx Protein with Differential Antiviral Activity. *Biochem Genet*. 2006 Sept 6, 244(9-10):437-48.
- ¹⁸² Meier E, Kunz G, Haller O, Arnheiter H. Activity of rat Mx proteins against a rhabdovirus. *J Virol*. 1990 Dec;64(12):6263-9.
- ¹⁸³ Engelhardt OG, Sirma H, Pandolfi PP, Haller O. Mx1 GTPase accumulates in distinct nuclear domains and inhibits influenza A virus in cells that lack promyelocytic leukaemia protein nuclear bodies. *J Gen Virol*. 2004 Aug;85(Pt 8):2315-26.
- ¹⁸⁴ Zurcher T, Pavlovic J, Staeheli P. Nuclear localization of mouse Mx1 protein is necessary for inhibition of influenza virus. *J Virol*. 1992 Aug;66(8):5059-66.
- ¹⁸⁵ Zurcher T, Pavlovic J, Staeheli P. Mechanism of human MxA protein action: variants with changed antiviral properties. *EMBO J*. 1992 Apr;11(4):1657-61.
- ¹⁸⁶ Pavlovic J, Haller O, Staeheli P. Human and mouse Mx proteins inhibit different steps of the influenza virus multiplication cycle. *J Virol*. 1992 Apr;66(4):2564-9.
- ¹⁸⁷ Landis H, Simon-Jodicke A, Kloti A, Di Paolo C, Schnorr JJ, Schneider-Schaulies S, Hefti HP, Pavlovic J. Human MxA protein confers resistance to Semliki Forest virus and inhibits the amplification of a Semliki Forest virus-based replicon in the absence of viral structural proteins. *J Virol*. 1998 Feb;72(2):1516-22.

- ¹⁸⁸ Schnorr JJ, Schneider-Schaulies S, Simon-Jodicke A, Pavlovic J, Horisberger MA, ter Meulen V. MxA-dependent inhibition of measles virus glycoprotein synthesis in a stably transfected human monocytic cell line. *J Virol*. 1993 Aug;67(8):4760-8.
- ¹⁸⁹ Kochs G, Haller O. Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of *Thogoto virus* nucleocapsids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Mar 2;96(5):2082-6.
- ¹⁹⁰ Kochs G, Haller O. GTP-bound human MxA protein interacts with the nucleocapsids of *Thogoto virus* (Orthomyxoviridae). *J Biol Chem*. 1999 Feb 12;274(7):4370-6.
- ¹⁹¹ Turan K, Mibayashi M, Sugiyama K, Saito S, Numajiri A, Nagata K. Nuclear MxA proteins form a complex with influenza virus NP and inhibit the transcription of the engineered influenza virus genome. *Nucleic Acids Res*. 2004 Jan 29;32(2):643-52.
- ¹⁹² Andersson I, Bladh L, Mousavi-Jazi M, Magnusson KE, Lundkvist A, Haller O, Mirazimi A. Human MxA protein inhibits the replication of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Virol*. 2004 Apr;78(8):4323-9.
- ¹⁹³ Reichelt M, Stertz S, Krijnse-Locker J, Haller O, Kochs G. Missorting of La Crosse virus nucleocapsid protein by the interferon-induced MxA GTPase involves smooth ER membranes. *Traffic*. 2004 Oct;5(10):772-84.
- ¹⁹⁴ Pavlovic J, Haller O, Staeheli P. Human and mouse Mx proteins inhibit different steps of the influenza virus multiplication cycle. *J Virol*. 1992 Apr;66(4):2564-9.
- ¹⁹⁵ Pavlovic J, Zurcher T, Haller O, Staeheli P. Resistance to influenza virus and vesicular stomatitis virus conferred by expression of human MxA protein. *J Virol*. 1990 Jul;64(7):3370-5.
- ¹⁹⁶ Pavlovic J, Arzet HA, Hefti HP, Frese M, Rost D, Ernst B, Kolb E, Staeheli P, Haller O. Enhanced virus resistance of transgenic mice expressing the human MxA protein. *J Virol*. 1995 Jul;69(7):4506-10.
- ¹⁹⁷ Frese M, Kochs G, Feldmann H, Hertkorn C, Haller O. Inhibition of Bunyaviruses, Phleboviruses, and Hantaviruses by human MxA protein. *J Virol*. 1996 Feb;70(2):915-23.
- ¹⁹⁸ Zhao H, De BP, Das T, Banerjee AK. Inhibition of human parainfluenza virus-3 replication by interferon and human MxA. *Virology*. 1996 Jun 15;220(2):330-8.
- ¹⁹⁹ Atreya PL, Kulkarni S. Respiratory syncytial virus strain A2 is resistant to the antiviral effects of type I interferons and human MxA. *Virology*. 1999 Sep 1;261(2):227-41.
- ²⁰⁰ Thimme R, Frese M, Kochs G, Haller O. Mx1 but not MxA confers resistance against tick-borne *Dhori virus* in mice. *Virology*. 1995 Aug 1;211(1):296-301.
- ²⁰¹ Staeheli P, Grob R, Meier E, Sutcliffe JG, Haller O. Influenza virus-susceptible mice carry Mx genes with a large deletion or a nonsense mutation. *Mol Cell Biol*. 1988 Oct;8(10):4518-23.
- ²⁰² Jin, H.K., Takada, A., Kon, Y., Haller, O. and Watanabe, T. Identification of the murine Mx2 gene : interferon-induced expression of the Mx2 protein from the feral mouse gene confers resistance to vesicular stomatitis virus. *J. Virol*. 1999 73, pp. 4925-4930.
- ²⁰³ Meier E, Kunz G, Haller O, Arnheiter H. Activity of rat Mx proteins against a Rhabdovirus. *J Virol*. 1990 Dec;64(12):6263-9.
- ²⁰⁴ Morozumi T, Sumantri C, Nakajima E, Kobayashi E, Asano A, Oishi T, Mitsunashi T, Watanabe T, Hamasima N. Three types of polymorphisms in exon 14 in porcine Mx1 gene. *Biochem Genet*. 2001 Aug;39(7-8):251-60.

- ²⁰⁵ Asano A, Ko JH, Morozumi T, Hamashima N, Watanabe T. Polymorphisms and the antiviral property of porcine Mx1 protein. *J Vet Med Sci.* 2002 Dec;64(12):1085-9.
- ²⁰⁶ Pavlovic J, Arzet HA, Hefti HP, Frese M, Rost D, Ernst B, Kolb E, Staeheli P, Haller O. Enhanced virus resistance of transgenic mice expressing the human MxA protein. *J Virol.* 1995 Jul;69(7):4506-10.
- ²⁰⁷ Pavlovic J, Zurcher T, Haller O, Staeheli P. Resistance to influenza virus and vesicular stomatitis virus conferred by expression of human MxA protein. *J Virol.* 1990 Jul;64(7):3370-5.
- ²⁰⁸ Marschall M, Zach A, Hechtfisher A, Foerst G, Meier-Ewert H, Haller O. Inhibition of influenza C viruses by human MxA protein. *Virus Res.* 2000 Apr;67(2):179-88.
- ²⁰⁹ Weber F, Haller O, Kochs G. MxA GTPase blocks reporter gene expression of reconstituted *Thogoto virus* ribonucleoprotein complexes. *J Virol.* 2000 Jan;74(1):560-3.
- ²¹⁰ Miura TA, Carlson JO, Beaty BJ, Bowen RA, Olson KE. Expression of human MxA protein in mosquito cells interferes with La Crosse virus replication. *J Virol.* 2001 Mar;75(6):3001-3.
- ²¹¹ Reichelt M, Stertz S, Krijnse-Locker J, Haller O, Kochs G. Missorting of La Crosse virus nucleocapsid protein by the interferon-induced MxA GTPase involves smooth ER membranes. *Traffic.* 2004 Oct;5(10):772-84.
- ²¹² Kanerva M, Melen K, Vaheri A, Julkunen I. Inhibition of puumala and tula hantaviruses in Vero cells by MxA protein. *Virology.* 1996 Oct 1;224(1):55-62.
- ²¹³ Andersson I, Bladh L, Mousavi-Jazi M, Magnusson KE, Lundkvist A, Haller O, Mirazimi A. Human MxA protein inhibits the replication of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Virol.* 2004 Apr;78(8):4323-9.
- ²¹⁴ Staeheli P, Pavlovic J. Inhibition of vesicular stomatitis virus mRNA synthesis by human MxA protein. *J Virol.* 1991 Aug;65(8):4498-501.
- ²¹⁵ Zhao H, De BP, Das T, Banerjee AK. Inhibition of human parainfluenza virus-3 replication by interferon and human MxA. *Virology.* 1996 Jun 15;220(2):330-8.
- ²¹⁶ Schnorr JJ, Schneider-Schaulies S, Simon-Jodicke A, Pavlovic J, Horisberger MA, ter Meulen V. MxA-dependent inhibition of *Measles virus* glycoprotein synthesis in a stably transfected human monocytic cell line. *J Virol.* 1993 Aug;67(8):4760-8.
- ²¹⁷ Gordien E, Rosmorduc O, Peltekian C, Garreau F, Brechot C, Kremsdorf D. Inhibition of *Hepatitis B virus* replication by the interferon-inducible MxA protein. *J Virol.* 2001 Mar;75(6):2684-91.
- ²¹⁸ Landis H, Simon-Jodicke A, Kloti A, Di Paolo C, Schnorr JJ, Schneider-Schaulies S, Hefti HP, Pavlovic J. Human MxA protein confers resistance to Semliki Forest virus and inhibits the amplification of a Semliki Forest virus-based replicon in the absence of viral structural proteins. *J.virol.* 1998 Feb;72(2):1516-22
- ²¹⁹ Chieux V, Chehadeh W, Harvey J, Haller O, Wattré P, Hober D. Inhibition of *coxsackievirus B4* replication in stably transfected cells expressing human MxA protein. *Virology.* 2001 Apr 25;283(1):84-92.
- ²²⁰ Pavlovic J, Haller O, Staeheli P. Human and mouse Mx proteins inhibit different steps of the influenza virus multiplication cycle. *J Virol.* 1992 Apr;66(4):2564-9.
- ²²¹ Frese M, Weeber M, Weber F, Speth V, Haller O. Mx1 sensitivity : *Batken virus* is an orthomyxovirus closely related to *Dhori virus*. *J Gen Virol.* 1997 Oct;78 (Pt 10):2453-8.
- ²²² Haller O, Frese M, Rost D, Nuttall PA, Kochs G. Tick-borne *Thogoto virus* infection in mice is inhibited by the orthomyxovirus resistance gene product Mx1. *J Virol.* 1995 Apr;69(4):2596-601.

- ²²³ Jin HK, Takada A, Kon Y, Haller O, Watanabe T. Identification of the murine Mx2 gene: interferon-induced expression of the Mx2 protein from the feral mouse gene confers resistance to *vesicular stomatitis virus*. *J Virol*. 1999 Jun;73(6):4925-30.
- ²²⁴ Jin HK, Yoshimatsu K, Takada A, Ogino M, Asano A, Arikawa J, Watanabe T. Mouse Mx2 protein inhibits hantavirus but not influenza virus replication. *Arch Virol*. 2001;146(1):41-9.
- ²²⁵ Sandrock M, Frese M, Haller O, Kochs G. Interferon-induced rat Mx proteins confer resistance to *Rift Valley fever virus* and other arthropod-borne viruses. *J Interferon Cytokine Res*. 2001 Sep;21(9):663-8.
- ²²⁶ Ko JH, Jin HK, Asano A, Takada A, Ninomiya A, Kida H, Hokiyama H, Ohara M, Tsuzuki M, Nishibori M, Mizutani M, Watanabe T. Polymorphisms and the differential antiviral activity of the chicken Mx gene. *Genome Res*. 2002 Apr;12(4):595-601.
- ²²⁷ Nakamura T, Asano A, Okano S, Ko JH, Kon Y, Watanabe T, Agui T. Intracellular localization and antiviral property of canine Mx proteins. *J Interferon Cytokine Res*. 2005 Mar;25(3):169-73.
- ²²⁸ Asano A, Ko JH, Morozumi T, Hamashima N, Watanabe T. Polymorphisms and the antiviral property of porcine Mx1 protein. *J Vet Med Sci*. 2002 Dec;64(12):1085-9.
- ²²⁹ Caipang CM, Hirono I, Aoki T. In vitro inhibition of fish rhabdoviruses by Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* Mx. *Virology*. 2003 Dec 20;317(2):373-82.
- ²³⁰ Larsen R, Rokenes TP, Robertsen B. Inhibition of infectious *pancreatic necrosis virus* replication by atlantic salmon Mx1 protein. *J Virol*. 2004 Aug;78(15):7938-44.
- ²³¹ Kibenge MJ, Munir K, Kibenge FS. Constitutive expression of Atlantic salmon Mx1 protein in CHSE-214 cells confers resistance to infectious salmon anaemia virus. *Virol J*. 2005 Aug 26;2:75.
- ²³² King MC, Raposo G, Lemmon MA. Inhibition of nuclear import and cell-cycle progression by mutated forms of the dynamin-like GTPase MxB. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jun 15;101(24):8957-62.
- ²³³ Ju LH, Onogi A, Ueda J, Yamada K, Nakatsu Y, Ohe M, Hata H, Sasaki K, Watanabe T. Polymorphic study of equine antiviral MXA gene. *Biochem Genet*. 2005 Jun;43(5-6):299-305.
- ²³⁴ Muller-Doblies D, Ackermann M, Metzler A. *In vitro* and *in vivo* detection of Mx gene products in bovine cells following stimulation with alpha/beta interferon and viruses. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002 Nov;9(6):1192-9.
- ²³⁵ Ransohoff RM, Maroney PA, Nayak DP, Chambers TM, Nilsen TW. Effect of human alpha A interferon on influenza virus replication in MDBK cells. *J Virol*. 1985 Dec;56(3):1049-52.
- ²³⁶ Ellinwood NM, McCue JM, Gordy PW, Bowen RA. Cloning and characterization of cDNAs for a bovine (*Bos taurus*) Mx protein. *J Interferon Cytokine Res*. 1998 Sep;18(9):745-55.
- ²³⁷ Ellinwood NM, Berryere TG, Fournier BP, Bowen RA, Buchanan FC, Schmutz SM. MX1 maps to cattle chromosome 1. *Anim Genet*. 1999 Apr;30(2):164-5.
- ²³⁸ Hug H, Costas M, Staeheli P, Aebi M, Weissmann C. Organization of the murine Mx gene and characterization of its interferon- and virus-inducible promoter. *Mol Cell Biol*. 1988 Aug;8(8):3065-79.
- ²³⁹ Tazi-Ahnini R, di Giovine FS, McDonagh AJ, Messenger AG, Amadou C, Cox A, Duff GW, Cork MJ. Structure and polymorphism of the human gene for the interferon-induced p78 protein (MX1): evidence of association with alopecia areata in the Down syndrome region. *Hum Genet*. 2000 Jun;106(6):639-45.

- ²⁴⁰ Reed, L. J. & Muench, HA simple method of estimating fifty per cent endpoints. 1938 Am J Hyg 27, 493–497.
- ²⁴¹ Berridge, M.V. and Tan, A.S. (1993) Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) : Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electrontransport in MTT reduction. Arch. Biochem. Biophys. **303**, 474-82.
- ²⁴² Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.
- ²⁴³ Barltrop, J.A. *et al.* 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3-(4-sulfophenyl) tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators..*Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1991 **1**, 611-4.
- ²⁴⁴ Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. 1990. J. Mol. Biol. 215:403-410.
- ²⁴⁵ Phillips, H.J. Dye exclusion test for cell viability. In : Tissue Culture – Methods and Application (eds P.F. Kruse & M.K. Patterson), 1973 p. 406. Academic Press, New York.
- ²⁴⁶ Vreede FT, Jung TE, Brownlee GG. Model suggesting that replication of influenza virus is regulated by stabilization of replicative intermediates. J Virol. 2004 Sep;78(17):9568-72.
- ²⁴⁷ Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- ²⁴⁸ Eden S, Cedar H. Role of DNA methylation in the regulation of transcription. Curr Opin Genet Dev. 1994 Apr;4(2):255-9. Review.
- ²⁴⁹ Ng HH, Jeppesen P, Bird A. Active repression of methylated genes by the chromosomal protein MBD1. Mol Cell Biol. 2000 Feb;20(4):1394-406.
- ²⁵⁰ Chiurazzi P, Pomponi MG, Pietrobono R, Bakker CE, Neri G, Oostra BA. Synergistic effect of histone hyperacetylation and DNA demethylation in the reactivation of the FMR1 gene. Hum Mol Genet. 1999 Nov;8(12):2317-23.
- ²⁵¹ L.J. Reed and H. Muench. A simple method of estimating fifty per cent end points. Am. J. Hygiene 27 1938 pp. 493–497.
- ²⁵² Fulton RW, Downing MM, Cummins JM. Antiviral effects of bovine interferons on bovine respiratory tract viruses. J Clin Microbiol. 1984 Apr;19(4):492-7.
- ²⁵³ Fleming EH, Kolokoltsov AA, Davey RA, Nichols JE, Roberts NJ. Respiratory Syncytial Virus F Envelope Protein Associates with Lipid Rafts without Requirement for Other Virus Proteins. J Virol. 2006 Sep 27.
- ²⁵⁴ Techaarpornkul S, Barretto N, Peeples ME. Functional analysis of recombinant respiratory syncytial virus deletion mutants lacking the small hydrophobic and/or attachment glycoprotein gene. J Virol. 2001 Aug;75(15):6825-34.
- ²⁵⁵ Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, Basta S, O'Neill R, Schickli J, Palese P, Henklein P, Bennink JR, Yewdell JW. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. Nat Med. 2001 Dec;7(12):1306-12.
- ²⁵⁶ Gibbs JS, Malide D, Hornung F, Bennink JR, Yewdell JW. The *Influenza A* virus PB1-F2 protein targets the inner mitochondrial membrane via a predicted basic amphipathic helix that disrupts mitochondrial function. J Virol. 2003 Jul;77(13):7214-24.

- ²⁵⁷ Newcombe, Robert G. "Interval Estimation for the Difference Between Independent Proportions: Comparison of Eleven Methods," *Statistics in Medicine*, 17, 873-890 (1998).
- ²⁵⁸ Meier E, Kunz G, Haller O, Arnheiter, H. Activity of rat Mx proteins against a rhabdovirus. *J Virol*. 1990 Dec;64(12):6263-9.
- ²⁵⁹ Landis H, Simon-Jodicke A, Kloti A, Di Paolo C, Schnorr JJ, Schneider-Schaulies S, Hefti HP, Pavlovic J. Human MxA protein confers resistance to Semliki Forest virus and inhibits the amplification of a Semliki Forest virus-based replicon in the absence of viral structural proteins. *J Virol*. 1998 Feb;72(2):1516-22.
- ²⁶⁰ Baise E, Pire G, Leroy M, Gerardin J, Goris N, De Clercq K, Kerkhofs P, Desmecht D. Conditional expression of type I interferon-induced bovine Mx1 GTPase in a stable transgenic vero cell line interferes with replication of vesicular stomatitis virus. *J Interferon Cytokine Res*. 2004 Sep;24(9):513-21.
- ²⁶¹ Leroy M, Baise E, Pire G, Gerardin J, Desmecht D. Resistance of Paramyxoviridae to type I interferon-induced *Bos taurus* Mx1 dynamin. *J Interferon Cytokine Res*. 2005 Apr;25(4):192-201.
- ²⁶² Zhao H, De BP, Das T, Banerjee AK. Inhibition of human *Parainfluenza virus-3* replication by interferon and human MxA. *Virology*. 1996 Jun 15;220(2):330-8.
- ²⁶³ Choudhary S, Gao J, Leaman DW, De BP. Interferon action against human *Parainfluenza virus* type 3: involvement of a novel antiviral pathway in the inhibition of transcription. *J Virol*. 2001 May;75(10):4823-31.
- ²⁶⁴ Atreya PL, Kulkarni S. Respiratory syncytial virus strain A2 is resistant to the antiviral effects of type I interferons and human MxA. *Virology*. 1999 Sep 1;261(2):227-41.
- ²⁶⁵ Marschall M, Zach A, Hechtfisher A, Foerst G, Meier-Ewert H, Haller O. Inhibition of influenza C viruses by human MxA protein. *Virus Res*. 2000 Apr;67(2):179-88.
- ²⁶⁶ Kochs G, Haller O. Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of *Thogoto virus* nucleocapsids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Mar 2;96(5):2082-6.
- ²⁶⁷ Pavlovic J., Zurcher, T., Haller, O. and Staeheli, P. (1990) Resistance to influenza virus and vesicular stomatitis virus conferred by expression of human MxA protein. *J. Virol.*, 64:, 3370–3375.
- ²⁶⁸ Frese M, Kochs G, Meier-Dieter U, Siebler J, Haller O. Human MxA protein inhibits tick-borne *Thogoto virus* but not *Dhori virus*. *J Virol*. 1995 Jun;69(6):3904-9.
- ²⁶⁹ Andersson I, Bladh L, Mousavi-Jazi M, Magnusson KE, Lundkvist A, Haller O, Mirazimi A. Human MxA protein inhibits the replication of *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*. *J Virol*. 2004 Apr;78(8):4323-9.
- ²⁷⁰ Turan K, Mibayashi M, Sugiyama K, Saito S, Numajiri A, Nagata K. Nuclear MxA proteins form a complex with influenza virus NP and inhibit the transcription of the engineered influenza virus genome. *Nucleic Acids Res*. 2004 Jan 29;32(2):643-52.
- ²⁷¹ Kochs G, Haller O. GTP-bound human MxA protein interacts with the nucleocapsids of *Thogoto virus* (Orthomyxoviridae). *J Biol Chem*. 1999 Feb 12;274(7):4370-6.
- ²⁷² Kochs G, Janzen C, Hohenberg H, Haller O. Antivirally active MxA protein sequesters La Crosse virus nucleocapsid protein into perinuclear complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Mar 5;99(5):3153-8.
- ²⁷³ Zurcher T, Pavlovic J, Staeheli P. Nuclear localization of mouse Mx1 protein is necessary for inhibition of influenza virus. *J Virol*. 1992 Aug;66(8):5059-66.

- ²⁷⁴ Stranden AM, Staeheli P, Pavlovic J. Function of the mouse Mx1 protein is inhibited by overexpression of the PB2 protein of influenza virus. *Virology*. 1993 Dec;197(2):642-51.
- ²⁷⁵ Staeheli P, Pavlovic J. Inhibition of vesicular stomatitis virus mRNA synthesis by human MxA protein. *J Virol*. 1991 Aug;65(8):4498-501.
- ²⁷⁶ Zurcher T, Pavlovic J, Staeheli P. Nuclear localization of mouse Mx1 protein is necessary for inhibition of influenza virus. *J Virol*. 1992 Aug;66(8):5059-66.
- ²⁷⁷ Pavlovic J, Haller O, Staeheli P. Human and mouse Mx proteins inhibit different steps of the influenza virus multiplication cycle. *J Virol*. 1992 Apr;66(4):2564-9.
- ²⁷⁸ Melen K, Julkunen I. Mutational analysis of murine Mx1 protein: GTP binding core domain is essential for anti-influenza A activity. *Virology*. 1994 Nov 15;205(1):269-79.
- ²⁷⁹ Pitossi F, Blank A, Schroder A, Schwarz A, Hussi P, Schwemmler M, Pavlovic J, Staeheli P. A functional GTP-binding motif is necessary for antiviral activity of Mx proteins. *J Virol*. 1993 Nov;67(11):6726-32.
- ²⁸⁰ Garber EA, Hreniuk DL, Scheidel LM, van der Ploeg LH. Mutations in murine Mx1: effects on localization and antiviral activity. *Virology*. 1993 Jun;194(2):715-23.
- ²⁸¹ Janzen C, Kochs G, Haller O. A monomeric GTPase-negative MxA mutant with antiviral activity. *J Virol*. 2000 Sep;74(17):8202-6.
- ²⁸² Ponten A, Sick C, Weeber M, Haller O, Kochs G. Dominant-negative mutants of human MxA protein: domains in the carboxy-terminal moiety are important for oligomerization and antiviral activity. *J Virol*. 1997 Apr;71(4):2591-9.
- ²⁸³ Engelhardt OG, Sirma H, Pandolfi PP, Haller O. Mx1 GTPase accumulates in distinct nuclear domains and inhibits influenza A virus in cells that lack promyelocytic leukaemia protein nuclear bodies. *J Gen Virol*. 2004 Aug;85(Pt 8):2315-26.
- ²⁸⁴ Gorisch SM, Wachsmuth M, Ittrich C, Bacher CP, Rippe K, Lichter P. Nuclear body movement is determined by chromatin accessibility and dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Sep 7;101(36):13221-6. Epub 2004 Aug 26.
- ²⁸⁵ Accola MA, Huang B, Al Masri A, McNiven MA. The antiviral dynamin family member, MxA, tubulates lipids and localizes to the smooth endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 2002 Jun 14;277(24):21829-35. Epub 2002 Mar 26.
- ²⁸⁶ Lakadamyali M, Rust MJ, Zhuang X. Endocytosis of influenza viruses. *Microbes Infect*. 2004 Aug;6(10):929-36. Review.
- ²⁸⁷ Roy AM, Parker JS, Parrish CR, Whittaker GR. Early stages of influenza virus entry into Mv-1 lung cells: involvement of dynamin. *Virology*. 2000 Feb 1;267(1):17-28.
- ²⁸⁸ Vreede FT, Jung TE, Brownlee GG. Model suggesting that replication of influenza virus is regulated by stabilization of replicative intermediates. *J Virol*. 2004 Sep;78(17):9568-72.
- ²⁸⁹ Gunning RF, Brown IH, Crawshaw TR. Evidence of influenza A virus infection in dairy cows with sporadic milk drop syndrome. *Vet Rec*. 1999 Nov 6;145(19):556-7.
- ²⁹⁰ Graham DA, Calvert V, McLaren E. Retrospective analysis of serum and nasal mucus from cattle in Northern Ireland for evidence of infection with influenza A virus. *Vet Rec*. 2002 Feb 16;150(7):201-4.
- ²⁹¹ Rust MJ, Lakadamyali M, Zhang F, Zhuang X. Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nat Struct Mol Biol*. 2004 Jun;11(6):567-73. Epub 2004 May 2.

- ²⁹² Lakadamyali M, Rust MJ, Zhuang X. Endocytosis of influenza viruses. *Microbes Infect.* 2004 Aug;6(10):929-36.
- ²⁹³ Sever S, Damke H, Schmid SL. Dynamin:GTP controls the formation of constricted coated pits, the rate limiting step in clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol.* 2000 Sep 4;150(5):1137-48.
- ²⁹⁴ Henley JR, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA. Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J Cell Biol.* 1998 Apr 6;141(1):85-99.
- ²⁹⁵ Hill E, van Der Kaay J, Downes CP, Smythe E. The role of dynamin and its binding partners in coated pit invagination and scission. *J.Cell.Biol.* 2001 Jan 22;152(2):309-23.
- ²⁹⁶ Sever S, Skoch J, Newmyer S, Ramachandran R, Ko D, McKee M, Bouley R, Ausiello D, Hyman BT, Bacsikai BJ. Physical and functional connection between auxilin and dynamin during endocytosis. *EMBO J.* 2006 Sep 20;25(18):4163-74. Epub 2006 Aug 31.
- ²⁹⁷ Macia E, Ehrlich M, Massol R, Boucrot E, Brunner C, Kirchhausen T. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell.* 2006 Jun;10(6):839-50.
- ²⁹⁸ Sun X, Yau VK, Briggs BJ, Whittaker GR. Role of clathrin-mediated endocytosis during vesicular stomatitis virus entry into host cells. *Virology.* 2005 Jul 20;338(1):53-60.
- ²⁹⁹ Snyers L, Zwickl H, Blaas D. Human rhinovirus type 2 is internalized by clathrin-mediated endocytosis. *J Virol.* 2003 May;77(9):5360-9.
- ³⁰⁰ Bayer N, Schober D, Huttinger M, Blaas D, Fuchs R. Inhibition of clathrin-dependent endocytosis has multiple effects on human rhinovirus serotype 2 cell entry. *J Biol Chem.* 2001 Feb 9;276(6):3952-62.
- ³⁰¹ Ann-Marie M.Roy, John S.Parker, Colin R ;Parrish, and Gary R.Whittaker. Early stages of Influenza virus entry into Mv-1 lung cells : involvement of dynamin . *Virology* 267, 17-28 (2000).
- ³⁰² Jin M, Park J, Lee S, Park B, Shin J, Song KJ, Ahn TI, Hwang SY, Ahn BY, Ahn K. Hantaan virus enters cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *Virology.* 2002 Mar 1;294(1):60-9.
- ³⁰³ Kim Y, Chang S. Ever-expanding network of dynamin-interacting proteins. *Mol Neurobiol.* 2006 Oct;34(2):129-36. Review.
- ³⁰⁴ Sara B.Sieczkarski and Gary R ;Whittaker. Differential requirements of Rab5 and Rab7 for endocytosis of Influenza and other envelopped viruses. *Traffic* 2003, 4 : 333-343.
- ³⁰⁵ Rebecca khor, Lj. McElroy and Gary R.Whittaker. The ubiquitin-vacuolar protein sorting system is selectively required during entry of Influenza virus into host cells. *Traffic* 2003, 4 : 857-868.