

Université de Montréal

**Étude des déterminants de l'induction et de la sensibilité à  
l'interféron chez le réovirus de mammifères**

par Delphine Lanoie

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise  
en Microbiologie et Immunologie

Décembre 2018

© Delphine Lanoie, 2018

## Résumé

Le réovirus de mammifères est à l'étude comme virus oncolytique pouvant détruire de manière préférentielle les cellules cancéreuses. Bien que les déterminants viraux et cellulaires responsables soient mal connus, les voies de signalisation reliées à l'interféron sont probablement impliquées. Deux isolats viraux différant dans leur sensibilité à l'interféron ont précédemment été obtenus et leur séquence nucléotidique a été déterminée. Afin d'établir l'importance des différences entre ces deux virus (T3D<sup>K</sup> et VeroAV) et le virus sauvage (T3D<sup>S</sup>), les plasmides portant chacun des gènes viraux correspondants ont été mutés. Les virus portant différentes combinaisons de gènes de T3D<sup>K</sup> ou VeroAV dans un fond génétique T3D<sup>S</sup> ont ensuite été récupérés par transfection de cellules par la technique de « génétique inverse ». Le virus T3D<sup>K</sup> est non seulement plus sensible à l'interféron que le T3D<sup>S</sup>, mais il est aussi en mesure d'induire beaucoup plus fortement la production d'interféron. Nous avons été en mesure de montrer que le phénotype de sensibilité est dû à la présence suffisante des protéines  $\mu 2$  et  $\lambda 2$  du T3D<sup>K</sup> alors que sa capacité à induire les voies reliées à l'interféron serait plutôt associée à la combinaison de ses protéines  $\mu 2$  et  $\lambda 1$ . D'autre part, le virus VeroAV est également plus sensible à l'interféron que le virus T3D<sup>S</sup>, sans toutefois induire davantage d'interféron. Le phénotype de sensibilité est, dans ce cas-ci, dû à une unique mutation ponctuelle dans le gène S1 du virus. Cette mutation modifie à la fois la protéine  $\sigma 1$  et  $\sigma 1s$  de VeroAV, mais il semble que ce soit son impact sur la protéine non-structurale  $\sigma 1s$  qui soit responsable du phénotype de sensibilité observé. Les résultats ont donc démontré que les phénotypes d'induction et de sensibilité à l'interféron peuvent dépendre de multiples déterminants viraux et que ce sont des propriétés partiellement dissociables génétiquement.

La sélection de mutants sensibles à l'interféron suivi de leur caractérisation par l'approche de génétique inverse pourra certainement contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'oncotropisme du réovirus de mammifères.

**Mots-clés :** Réovirus, Interféron, Génétique inverse

## Abstract

Mammalian reovirus is currently under study as an oncolytic virus that can preferentially kill cancer cells. Although the viral and cellular determinants responsible are poorly understood, the interferon-related signaling pathways are probably involved. Two viral isolates differing in their sensitivity to interferon were previously obtained and their nucleotide sequence was determined. In order to establish the importance of the differences between these two viruses (T3D<sup>K</sup> and VeroAV) and the wild-type virus (T3D<sup>S</sup>), the plasmids carrying each of the corresponding viral genes were mutated. Viruses carrying different combinations of T3D<sup>K</sup> or VeroAV genes in a T3D<sup>S</sup> genetic background were then recovered by transfection of cells using the "reverse genetics" technique. T3D<sup>K</sup> virus is not only more sensitive to interferon than T3D<sup>S</sup>, but it also induces much more interferon production. We were able to show that the sensitivity phenotype is solely due to the presence of the T3D<sup>K</sup>  $\mu$ 2 and  $\lambda$ 2 proteins, whereas its ability to induce the interferon-related pathways is rather associated with the combination of its  $\mu$ 2 and  $\lambda$ 1 proteins. On the other hand, the VeroAV virus is also more sensitive to interferon than the T3D<sup>S</sup> virus, without however inducing more interferon. The sensitivity phenotype is, in this case, due to a single point mutation in the virus S1 gene. This mutation modifies both the  $\sigma$ 1 and  $\sigma$ 1s protein of VeroAV, but it seems that it is its impact on the non-structural protein  $\sigma$ 1s that is responsible for the observed sensitivity phenotype. The results thus demonstrated that phenotypes of induction and sensitivity to interferon are partially genetically dissociable properties and that they may be dependent on multiple viral determinants.

The selection of interferon-sensitive mutants followed by their characterization with the reverse genetics approach will certainly contribute to a better understanding of the mechanisms involved in the mammalian reovirus oncotropism.

**Keywords** : Reovirus, Interferon, Reverse genetics

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations.....	9
Remerciements.....	13
1 Caractéristiques générales de Réovirus.....	15
1.1 Taxonomie.....	15
1.1.1 Le réovirus de mammifères.....	15
1.2 Structure moléculaire.....	16
1.3 Cycle de réplication.....	19
1.4 Épidémiologie et Pathogénicité.....	21
1.5 Activité oncolytique.....	22
1.5.1 Généralités.....	23
1.5.2 Réovirus, un virus naturellement oncolytique.....	24
1.5.2.1 Importance de l'oncogène Ras dans l'activité oncolytique de réovirus.....	24
1.5.2.2 Essais cliniques avec Reolysin®.....	25
1.5.3 Avantages et limites.....	26
2 Interféron.....	28
2.1 Mécanisme général de la réponse antivirale IFN.....	28
2.1.1 Réovirus et les voies de signalisation reliées à l'IFN.....	29
2.2 Effets antiviraux de différents ISGs.....	31
2.3 Mécanismes viraux inhibiteurs de la voie IFN chez réovirus.....	33
2.3.1 La protéine $\sigma 3$ .....	33
2.3.2 La protéine $\mu 2$ .....	34
2.3.3 La protéine $\mu NS$ .....	34
2.3.4 La protéine $\lambda 2$ .....	35
3 Sélection de mutants de réovirus sensibles à l'IFN.....	36

3.1	Mutagenèse chimique et le mutant P4L-12 .....	36
3.2	Persistence virale et le mutant VeroAV .....	37
3.2.1	Principe .....	37
3.2.2	Obtention du mutant VeroAV .....	38
4	Génétique inverse.....	40
4.1	Concept et origine.....	40
4.2	Derniers développements.....	42
5	Contexte du projet et hypothèse.....	43
6	Objectifs.....	45
7	Résultats .....	46
7.1	Étude de l'induction et de la sensibilité à l'IFN chez T3D <sup>K</sup> .....	46
7.1.1	Research highlights.....	47
7.1.2	Abstract .....	49
7.1.3	Introduction.....	50
7.1.4	Materials and methods .....	51
7.1.4.1	Cell lines and viruses .....	51
7.1.4.2	Reovirus reverse genetics .....	52
7.1.4.3	Determination of interferon sensitivity.....	53
7.1.4.4	Determination of interferon induction .....	53
7.1.5	Results.....	53
7.1.5.1	Generation and characterization of T3D <sup>S</sup> /T3D <sup>K</sup> monoreassortants.....	53
7.1.5.2	Introduction of different T3D <sup>K</sup> gene combinations in T3D <sup>S</sup> background ....	54
7.1.5.3	Induction of interferon by T3D <sup>K</sup> gene combinations in T3D <sup>S</sup> background..	55
7.1.6	Discussion.....	56
7.1.7	Acknowledgments.....	59
7.1.8	References.....	60
7.2	Étude de la sensibilité à l'IFN chez VeroAV.....	75
7.2.1	Research highlights:.....	76
7.2.2	Abstract.....	78
7.2.3	Introduction.....	79
7.2.4	Results.....	81

7.2.4.1	Sequencing of the VeroAV genome .....	81
7.2.4.2	Reverse genetics rescue and characterization of VeroAV .....	81
7.2.4.3	Introduction of different VeroAV genes in the T3D <sup>S</sup> background .....	82
7.2.4.4	Introduction of single mutations in the S1 gene .....	83
7.2.4.5	Effect of $\sigma$ 1s on interferon sensitivity .....	83
7.2.5	Discussion .....	84
7.2.6	Materials and methods .....	87
7.2.6.1	Cell lines and viruses .....	87
7.2.6.2	Sequencing of the whole VeroAV genome .....	87
7.2.6.3	Reovirus reverse genetics .....	88
7.2.6.4	Determination of interferon induction .....	88
7.2.6.5	Determination of interferon sensitivity .....	89
7.2.7	Acknowledgments .....	89
7.2.8	References .....	89
8	Discussion et perspectives .....	104
8.1	Étude de l'induction et de la sensibilité à l'IFN chez T3D <sup>K</sup> .....	104
8.1.1	Résumé .....	104
8.1.2	Discussion .....	105
8.1.2.1	Les protéines $\mu$ 2, $\lambda$ 2 et $\lambda$ 1; mécanistique impliquée? .....	105
8.1.2.2	L'activité ATPase virale en lien avec l'induction d'IFN? .....	108
8.1.2.3	Concept de « souche sauvage » .....	109
8.1.3	Autres perspectives .....	110
8.2	Étude de la sensibilité à l'IFN chez VeroAV .....	112
8.2.1	Résumé .....	112
8.2.2	Discussion .....	112
8.2.2.1	Une induction d'IFN semblable à celle du T3D <sup>S</sup> .....	112
8.2.2.2	Les mutations sur le gène S1 de VeroAV ; un lien? .....	113
8.2.2.3	$\sigma$ 1s contribue à la synthèse optimale des protéines virales .....	114
8.2.2.4	$\sigma$ 1s serait impliquée dans la sensibilité du virus à l'action antivirale de l'IFN .....	115
8.2.2.5	Une découverte surprenante .....	116

8.2.3	Autres perspectives et difficultés rencontrées.....	116
8.3	Avenues connexes : oncotropisme.....	117
9	Conclusion .....	119
10	Bibliographie.....	120
11	Annexe .....	i
11.1	Autres contributions.....	i
11.1.1	Présentations orales.....	i
11.1.2	Affiches présentées à l’occasion de congrès internationaux.....	i

## Liste des tableaux

<b>Tableau I.</b>	Liste des gènes et protéines de réovirus.....	17
<b>Tableau II.</b>	Avantages et limites de la virothérapie.....	27
<b>Tableau III.</b>	(Table 1) Sequence differences between T3D <sup>S</sup> and the reverse genetics virus T3D <sup>K</sup> .....	68
<b>Tableau IV.</b>	(Table 1) Amino acids differences between wild-type reovirus type 3 Dearing laboratory stock (T3D <sup>S</sup> ) and derived Vero-cell-adapted virus (VeroAV).....	99



## Liste des figures

<b>Figure 1.</b>	Réovirus et ses différentes formes.....	18
<b>Figure 2.</b>	Cycle de réplication de réovirus .....	21
<b>Figure 3.</b>	Voies de signalisation menant à l'induction d'interféron de type 1 et à la synthèse d'ISGs suite à une infection virale par réovirus.....	30
<b>Figure 4.</b>	Protéines de réovirus connues pour avoir un rôle antagoniste dans la voie IFN ..	33
<b>Figure 5.</b>	Processus de persistance virale ayant mené à l'obtention du mutant VeroAV.....	38
<b>Figure 6.</b>	Principe du système de génétique inverse utilisant les dix segments de réovirus clonés sur des plasmides. ....	41
<b>Figures de l'article 1</b>		
<b>Figure 1.</b>	Interferon sensitivity of virus monoreassortants.....	69
<b>Figure 2.</b>	Interferon sensitivity of multiple reassortants.....	70
<b>Figure 3.</b>	Sensitivity of double reassortant viruses to different interferon concentrations...	71
<b>Figure 4.</b>	Interferon induction by viral reassortants. ....	72
<b>Figure 5.</b>	Positions of $\lambda 2$ amino acid substitutions on the crystal structure (PDB1EJ6). ....	73
<b>Figure 6.</b>	(Fig.S1.) Replicative ability of parental and reassortant viruses. ....	74
<b>Figures de l'article 2</b>		
<b>Figure 1.</b>	Comparison of interferon induction by the two rescued viruses. ....	100
<b>Figure 2.</b>	Interferon sensitivity of T3D <sup>S</sup> harboring VeroAV genes. ....	101
<b>Figure 3.</b>	Sensitivity of reassortant viruses to different interferon concentrations. ....	102
<b>Figure 4.</b>	Interferon sensitivity of the $\sigma 1s$ -null (knockout) virus. ....	103
<b>Figures de la discussion</b>		
<b>Figure 1.</b>	Induction d'interleukine-6 par différents réassortants viraux.....	109
<b>Figure 2.</b>	Mutations retrouvées chez VeroAV au niveau des protéines $\sigma 1$ et $\sigma 1s$ , codées par le gène S1.....	113

## Liste des abréviations

%	Pourcentage
°C	Degré celcius
µg	Microgramme
µl	Microlitre
a.a	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARV	Avian orthoreovirus
BHK	Baby hamster kidney cells
BroV	Broome orthoreovirus
BRV	Baboon orthoreovirus
db	Double-brin (bicaténaire)
DENV	Dengue virus
eIf2 $\alpha$	Eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$
FAST	Fusion-associated-small-protein
FDA	Food and drugs administration
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GTP	Guanosine triphosphate
HCV	Hepatitis C virus
HSV	Herpes simplex virus
ICP0	Infected cell protein 0
IFIT	Interferon-induced protein with tetratricopeptide
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon alpha/beta receptor
IL-6	Interleukine 6
IPS-1	Interferon beta promoter stimulator protein 1
IRF1/3/5/7/9	Interferon regulatory factor 1/3/5/7/9

ISG	Interferon-stimulated gene
ISG20	Interferon-stimulated gene 20
ISGF3	Interferon-stimulated gene factor 3
ISRE	Interferon-sensitive response element
ISVP	Infectious subviral particle
JAK1	Janus kinase 1
JAM-A	Junctional adhesion molecule A
kDa	KiloDalton
MAHLV	Mahlapitsi virus
MAVS	Mitochondrial antiviral-signaling protein
MDA5	Melanoma differentiation-associated protein 5
MEL	Murine erythroleukemia cells
MEM	Minimum essential medium
ml	Millilitre
MOI	Multiplicity of infection
MRV	Mammalian orthoreovirus
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
NBV	Nelson Bay orthoreovirus
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa B
ng	Nanogramme
NS1	Non-structural protein 1 (Influenza)
NS5A	Non-structural protein 5A
NSP1	Non-structural protein 1 (Rotavirus)
NTG	Nitrosoguanidine
p53	Protéine 53
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PCR	Polymerase chain reaction
PKR	Double-stranded RNA-dependant protein kinase
PRR	Pattern recognition receptor
PRV	Piscine orthoreovirus

Ras	Rat sarcoma protein
RIG-I	Retinoic acid-inductible gene-I
RLR	RIG-I-like receptor
RRV	Reptilian orthoreovirus
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
shRNA	Short hairpin RNA
STAT1/2	Signal transducer and activator of transcription 1/2
T1L	Réovirus Type 1 Lang
T2J	Réovirus Type 2 Jones
T3A	Réovirus Type 3 Abney
T3D	Réovirus Type 3 Dearing
T4N	Réovirus Type 4 Ndelle
TBK1	Serine/Threonine-protein kinase
TLR	Toll-like receptor
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon beta
T-VEC	Talimogene laherparepvec
TYK2	Tyrosine kinase 2
VSV	Vesicular stomatitis virus
VV	Vaccine virus
WNV	West Nile virus
Wt	Wild type (souche sauvage)
$\alpha$	Alpha
$\beta$	Beta

*À toutes les femmes de science,*

## Remerciements

Il est bien évident que mon premier remerciement est pour mon directeur de recherche, Dr Guy Lemay. Je me considère réellement chanceuse d'avoir appris à vos côtés, Dr Lemay. Vous êtes non seulement un pédagogue hors pair, mais vous êtes aussi un mentor exceptionnel. Vous avez toujours fait preuve d'écoute et de bons conseils. Par-dessus tout, je vous remercie pour toute la confiance que vous avez toujours eue en moi, cela m'a motivée à maintes reprises lorsque les choses n'allaient pas comme prévu au labo! Votre dévouement, votre implication et surtout votre passion, me resteront. Merci.

Merci à ma mère, Guylaine. Tu as toujours su trouver les mots justes, dans les bons comme dans les moins bons moments. Tes encouragements ont été plus précieux que tu ne pourras jamais l'imaginer. Merci à mon père, Claude. Ton intérêt sincère envers mes études me faisait toujours chaud au cœur et nos discussions à ce sujet étaient toujours plaisantes à partager. Merci à vous deux de m'avoir appuyée financièrement et de m'avoir aidée à accéder à des études supérieures. Je vous en serai toujours reconnaissante.

Merci à mon frère, qui est capable de me faire tellement rire que j'en oublie toutes mes préoccupations. Les moments qu'on passe ensemble sont très précieux pour moi.

À mes grands-parents, à tous les autres membres de ma famille ainsi qu'à mes amis, merci pour votre appui et votre certitude constante et inébranlable que j'allais réussir. Tous à votre façon, vous m'avez aidée à franchir cette étape!

Je voudrais remercier tous ceux et celles que j'ai eu la chance de connaître durant ces années au laboratoire.

Merci à Stéphanie Côté. Quand je suis arrivée au labo, tu m'as tout montré avec patience et rigueur. Ton aide et ta disponibilité ont toujours été appréciés.

Merci à mes deux stagiaires, Rémi Laflamme et Guillaume Beaudoin-Bussières. Votre compagnie était toujours motivante et vos questions, stimulantes.

Un merci particulier à Simon Boudreault, venu directement de Sherbrooke passer quelques mois au laboratoire. Merci pour les échanges scientifiques et pour ton amitié. Tu es quelqu'un de vraiment génial et certainement parmi les gens les plus brillants que je connaisse.

Merci aussi à Emmanuelle DeGeorges. Emma, tes expressions françaises et ta candeur m'ont permis de franchir les dernières étapes de mon parcours en n'ayant pas trop la flemme! Merci pour ta présence et tes phrases d'encouragements ressenties.

J'ai évidemment une pensée spéciale pour mes collègues, membres des laboratoires adjacents. Merci pour votre sourire et votre coopération lors de nos échanges. Finalement aux amitiés que j'ai développées durant mon parcours universitaire et qui ont fait de ces années une période de ma vie que je n'oublierai jamais. Merci à vous, Dave, Geneviève, Jérémy, Élyse et plusieurs autres.

Finalement, merci à tous les membres du personnel du département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie de l'UdeM. Que ce soit les professeurs, coordonnateurs de travaux pratiques, techniciens, adjoint/e, TDGE, secrétaires, vous avez fait de ces dernières années une expérience inoubliable pour moi.

# 1 Caractéristiques générales de Réovirus

## 1.1 Taxonomie

La grande famille des *Reoviridae* regroupe, à ce jour, quinze genres parmi lesquels on retrouve des virus capables d'infecter des vertébrés, des invertébrés, des végétaux et même des organismes eucaryotes tels que les mycètes. Ce sont des virus non-enveloppés dont le génome est composé de 9 à 12 segments d'ARN bicaténaire linéaire. Cette famille est scindée en 2 sous-catégories, soit les *Spinareovirinae* et les *Sedoreovirinae*, selon la présence ou l'absence de tourelles aux 12 sommets de la structure icosaédrale des virions (Dermody et al., 2013).

Le genre Orthoreovirus, membre de la sous-catégorie des *Spinareovirinae* regroupe quant à lui six espèces. On y trouve l'orthoreovirus de mammifères (MRV), l'orthoreovirus aviaire (ARV), l'orthoreovirus de babouin (BRV), l'orthoreovirus « Nelson Bay » (NBV), l'orthoreovirus de reptiles (RRV) et l'orthoreovirus de poisson (PRV), récemment isolé chez des saumons d'élevage (Kibenge et al., 2013; Palacios et al., 2010 ; King et al., 2011). Au fil des années, de nouvelles espèces ne cessent d'être découvertes. Notamment, on a isolé en 2010 chez des chauves-souris frugivores, le « Broome orthoreovirus » (BroV) et en 2016 le « Mahlapitsi orthoreovirus » (MAHLV), qui ont été proposés en tant que nouvelles espèces du genre orthoreovirus (Jansen van Vuren et al., 2016; Thalmann et al., 2010).

### 1.1.1 Le réovirus de mammifères

Le réovirus de mammifères était initialement identifié sous le nom de « ECHO type 10 » et classé comme faisant partie de la famille des Entérovirus (Committee on the Echo Viruses, 1955). C'est en 1959 qu'Albert Sabin propose le nom réovirus pour *Respiratory Enteric Orphan virus* (Sabin, 1959). Cette nouvelle appellation découle du fait que ce virus est isolé du tractus respiratoire et intestinal chez des individus totalement asymptomatiques ou qui ne présentent que de modestes symptômes. Comme on ne l'associe à aucune pathologie grave chez l'humain, c'est pourquoi on le qualifie de virus orphelin. Il faudra patienter jusqu'en 1963 pour que soit découverte la structure génomique particulière des réovirus, composée d'ARN bicaténaire segmenté (Gomatos and Tamm, 1963). Au fil des années, différentes souches de réovirus ont



été identifiées et classées sous 4 sérotypes selon les propriétés de neutralisation et d'héماغglutination de la protéine d'attachement sigma1 ( $\sigma_1$ ). On retrouve donc le T1L (Type 1 Lang), le T2J (Type 2 Jones), le T3D (Type 3 Dearing) et T3A (Type 3 Abney) et finalement le T4N (Type 4 Ndelle) (Attoui et al., 2001 ; Dermody et al., 2013). Très peu d'études se sont focalisées sur T2J et T4N jusqu'à présent. Les deux sérotypes les plus étudiés sont le T1L et le T3D, qui présentent d'ailleurs des analogies de séquences assez importantes pour certaines de leurs protéines. À titre d'exemple, les protéines  $\mu_2$  de T1L et T3D sont identiques à 98% alors que la protéine  $\mu_2$  de T2J est apparentée à celle de T1L et T3D à seulement 80% (Coombs, 2008).

À titre informatif, le réovirus de mammifères de type 3 Dearing (T3D) est la souche utilisée et étudiée dans les travaux qui sont présentés dans ce mémoire.

## 1.2 Structure moléculaire

Au niveau structural, le réovirus n'est pas enveloppé, mais il possède une double capsidie protéique qui respecte une symétrie icosaédrale (N=12). À l'intérieur de la capsidie, qui fait de 70 à 80 nm, on retrouve le nucléoïde ou « core » contenant les 10 segments d'ARN bicaténaire de réovirus (**figure 1**). Les extrémités 5' des brins positifs portent une coiffe, mais les extrémités 3' ne sont pas poly-adénylées (King et al., 2011). Tous les gènes possèdent également des séquences conservées à leurs extrémités soit : 5' –GCUA et UCAUC-3'. Ces motifs assureraient un rôle important, entre autres, au niveau de la reconnaissance par la polymérase virale et de l'encapsidation des nouvelles particules virales (Dermody et al., 2013).

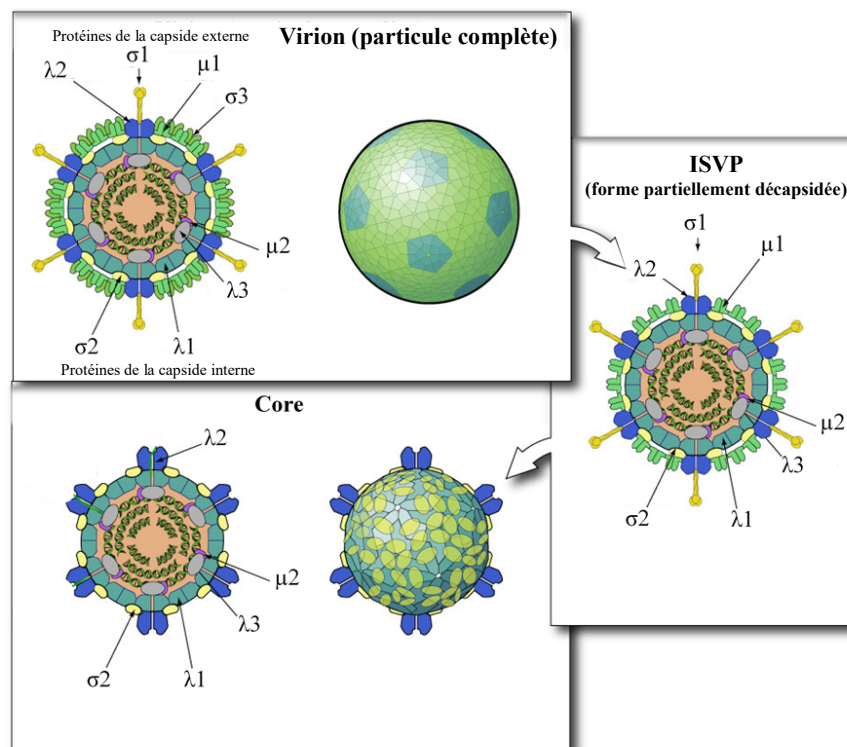
Les 10 segments composés d'ARN bicaténaire de réovirus ont été nommés selon leur patron de migration sur gel d'agarose. Le nom des gènes est donc en fonction de leur taille. On retrouve 3 grands segments « *large* » (L1,L2,L3) qui codent pour les protéines  $\lambda$  (lambda), 3 segments moyens « *medium* » (M1,M2,M3) qui codent pour les protéines  $\mu$  (mu) et 4 petits segments « *small* » (S1,S2,S3,S4) qui codent pour les protéines  $\sigma$  (sigma). Chacun de ces segments génomiques code pour 1 seule protéine, sauf M3 à partir duquel une deuxième protéine est synthétisée grâce à un codon d'initiation en aval du premier et S1, qui code pour une seconde protéine selon un cadre de lecture différent (Ernst and Shatkin, 1985; Jacobs et al., 1985) . On retrouve aussi des phénomènes de clivages protéolytiques permettant de générer plusieurs

protéines à partir d'un même produit de traduction (Borsa et al., 1981; Nibert and Fields, 1992). Il y a aussi des protéines non structurales, qui sont synthétisées au sein de la cellule infectée, mais qui ne sont pas incorporées dans les virions (Nibert et al., 1996; Wiener et al., 1989). Le **tableau I** présente un résumé des dix segments (gènes) de réovirus, des protéines qu'ils produisent et des rôles majeurs qui leur sont associés.

**Tableau I.** Liste des gènes et protéines de réovirus (Inspiré de Dermody et al., 2013)

Gènes	Protéines	Poids (kDa)	Localisation	Fonctions
<b>L1</b>	$\lambda 3$	142,3	Capside interne (nucléoïde)	ARN polymérase ARN dépendante S'associe avec $\mu$ NS
<b>L2</b>	$\lambda 2$	144	Transcapsidique	Forme les tourelles pentamériques permettant l'insertion de la protéine de fixation $\sigma 1$ Guanyltransférase et méthyltransférase Synthétise la coiffe des ARNm viraux
<b>L3</b>	$\lambda 1$	142	Capside interne (nucléoïde)	ARN hélicase ARN triphosphatase Transcription et synthèse de la coiffe ?
<b>M1</b>	$\mu 2$	83,3	Capside interne (nucléoïde)	S'associe avec $\mu$ NS au niveau des inclusions Stabilise les microtubules Sous-unité de la polymérase Contribue à la synthèse de la coiffe Antagoniste de l'IFN
<b>M2</b>	$\mu 1$	76,3	Capside externe	Impliqué dans la pénétration transmembranaire des endosomes Forme un hétérohexamère avec $\sigma 3$ Pro-apoptotique
<b>M3</b>	$\mu$ NS	80	Non-structurale (inclusions)	Forme les inclusions virales cytoplasmiques Protéine d'échafaudage s'associant à $\sigma$ NS, $\lambda 1$ , $\lambda 2$ , $\lambda 3$ , $\mu 2$ et $\sigma 2$ et avec l'ARNm viral
	$\mu$ NSC	75	Non-structurale	Fonction non connue Non nécessaire pour la répliation <i>in vitro</i>
<b>S1</b>	$\sigma 1$	49,2	Capside externe (spicule)	Protéine d'attachement se liant aux acides sialiques et au récepteur JAM-A (et NgR1) Détermine le sérotype, le tropisme cellulaire et tissulaire et la voie de dissémination Activité mucinolytique possible
	$\sigma 1s$	14	Non-structurale	Impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire Nécessaire pour la dissémination sanguine Non essentielle pour la répliation <i>in vitro</i> Requise pour expression protéique optimale
<b>S2</b>	$\sigma 2$	47,2	Capside interne (nucléoïde)	Se lie avec $\mu$ NS Lie faiblement l'ARN bicaténaire
<b>S3</b>	$\sigma$ NS	41	Non-structurale (inclusions)	Retrouvée tôt dans les inclusions virales S'associe avec $\mu$ NS Se lie fortement à l'ARN simple brin.
<b>S4</b>	$\sigma 3$	41,5	Capside externe	Stabilise la capsidie Forme un hétérohexamère avec $\mu 1$ Influence l'efficacité de la traduction protéique Inhibe l'activation de PKR

Les particules virales de réovirus sont constituées de 8 protéines structurales (**figure 1**). Il y a tout d'abord les protéines  $\mu 1$ ,  $\sigma 1$  et  $\sigma 3$  qui forment la capsid externe, puis les protéines  $\lambda 1$ ,  $\lambda 3$ ,  $\mu 2$  et  $\sigma 2$  qui sont retrouvées dans la capsid interne. La protéine  $\lambda 2$  est dite « transcapsidique », puisqu'elle forme les tourelles qui sont ancrées au niveau de la capsid interne et qui traversent la capsid externe jusqu'à la surface du virion. Lors du cycle infectieux, qui sera discuté un peu plus loin, le virus subit une décapsidation par des enzymes cellulaires. Ainsi, les particules virales sont d'abord partiellement décapsidées et deviennent des ISVP (*infectious subviral particle*) pour ensuite devenir des « core », la forme transcriptionnellement active.



**Figure 1.** Réovirus et ses différentes formes (Adaptée de Viral Zone, 2013).

Le virion est la forme complète du virus, arborant les différentes protéines de la capsid externe. Lors de la décapsidation partielle,  $\sigma 3$  sera dégradé et  $\mu 1$  sera clivée, le virus est à ce moment sous forme d'ISVP. Finalement, des clivages protéolytiques subséquents feront passer le virus sous forme de « core », une conformation non-infectieuse, mais transcriptionnellement active.

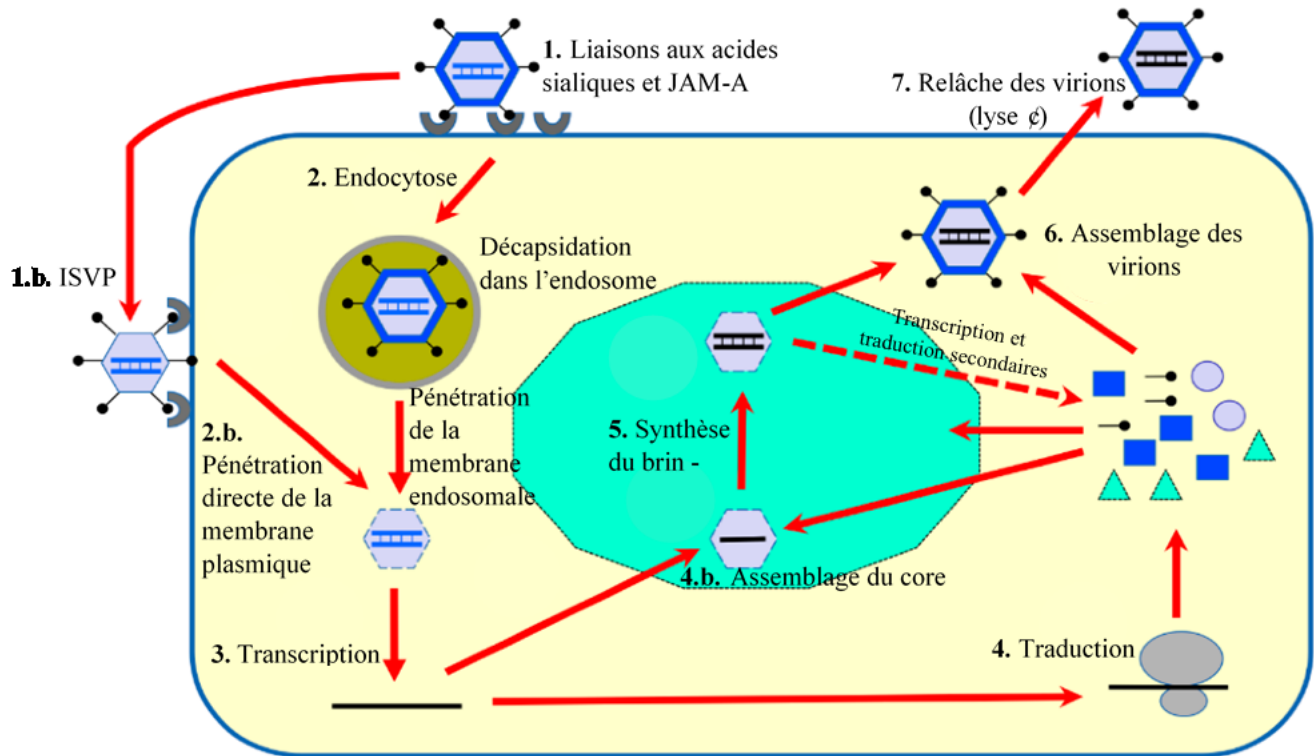
### 1.3 Cycle de réplication

Tel que son nom l'indique, le réovirus de mammifères est capable d'infecter pratiquement tous les mammifères, allant de la souris à l'humain. Le virus se transmet d'un hôte à l'autre via la route oro-fécale ou encore par la voie aérienne via les aérosols (Viral Zone, 2013). Tel qu'illustré à la **figure 2**, le réovirus se fixe aux cellules susceptibles de l'hôte grâce à sa protéine d'attachement  $\sigma 1$ . Des trimères de  $\sigma 1$  sont situés sur chacun des 12 sommets de la particule icosaèdre et leur forme allongée permet au virus de repérer et de fixer les récepteurs à la surface membranaire des cellules. Les principaux récepteurs qu'utilise réovirus sont les molécules d'adhésion JAM-A ainsi que les acides sialiques (Barton et al., 2001; Barton et al., 2003). Des études ont montré que réovirus était aussi en mesure de lier d'autres récepteurs, tel que mentionné plus loin. Une fois le virus fixé aux récepteurs, les  $\beta$ -intégrines vont permettre l'internalisation de la particule virale par endocytose (Maginnis et al., 2006). Une fois dans la cellule, le pH de la vésicule clathrine-dépendante s'acidifie et le virus subit une décapsidation partielle réalisée par des protéases lysosomiales qui se chargent de digérer la capsid externe (Dermody et al., 2013). Ce processus enzymatique retire toutes les protéines  $\sigma 3$  à la surface de la particule et induit un changement de conformation dans la protéine  $\sigma 1$ , ce qui permet au virus, maintenant sous forme d'ISVP, de traverser la membrane endosomale. Le réovirus peut aussi entrer dans les cellules par une méthode alternative qui n'implique pas de récepteurs cellulaires (**figure 2**). En effet, un environnement riche en protéases extracellulaires, telle que la lumière intestinale, permet et favorise la décapsidation des particules virales avant qu'elles n'entrent dans une cellule. Les particules décapsidées se retrouvent alors sous forme d'ISVP et elles ont la capacité de pénétrer directement la membrane cellulaire sans interaction avec un quelconque récepteur. Une étude de notre laboratoire a montré qu'un tel retrait de la capsid externe permettait à la particule virale d'acquérir une activité mucinolytique. Cela pourrait favoriser l'infection de cellules muqueuses recouvertes de mucine (Bisaillon et al., 1999).

Suite à ces deux modes d'entrée distincts, l'ISVP subit d'autres clivages protéolytiques pour qu'il ne reste que le nucléoïde ou « core », l'entité qui contient le matériel génétique viral et qui se retrouve dans le cytoplasme de la cellule-hôte. La transcription de l'ARN bicaténaire se fait directement au sein du nucléoïde grâce à l'ARN polymérase ARN dépendante  $\lambda 3$  qui est transportée à même la particule (Drayna and Fields, 1982). De cette manière, l'ARN bicaténaire

du virus n'est jamais exposé et ne peut pas être reconnu par la cellule. Les brins positifs nouvellement synthétisés à l'intérieur du nucléoïde s'échapperont de celui-ci via les tourelles présentes au niveau des sommets de la capsid. Ces ouvertures permettent aux ARNs messagers (brin+) de se rendre dans le cytoplasme afin d'être traduits en protéines. Les ARNs messagers viraux issus de la transcription primaire sont munis d'une coiffe à leur extrémité 5' et utilisent la machinerie ribosomale de la cellule pour assurer la traduction de leurs protéines (Schiff et al., 2007).

Parallèlement, d'autres copies de ces brins + sont encapsidées par ces mêmes protéines, afin d'amorcer l'assemblage des futures particules virales. À l'intérieur de ces futurs virions est incorporé un seul exemplaire de chacun des 10 segments d'ARN que possèdent réovirus. Tel que discuté plus haut, les séquences conservées aux extrémités de ces segments pourraient être impliquées dans ce processus précis de reconnaissance. La synthèse du brin – à partir du brin + se fait également à l'intérieur de ces futurs virions, de sorte que leur génome est constitué d'ARN bicaténaire. À noter que ces particules *de novo* peuvent aussi être utilisées pour faire une transcription secondaire d'ARNs messagers. La capsid externe est ensuite assemblée, générant ainsi des virus matures dont la relâche entraînera généralement la lyse cellulaire (Schiff et al., 2007). À noter que, lors d'une infection, les étapes de réplication et d'assemblage des particules virales seraient faites à l'intérieur de compartiments subcellulaires, appelés inclusions virales. Celles-ci seraient générées principalement par la protéine  $\mu$ NS de réovirus et par le recrutement important des microtubules, rôle assuré par la protéine  $\mu$ 2 (Broering et al., 2002; Eichwald et al., 2017). Ces structures sont visibles au microscope optique et peuvent prendre différentes formes selon le sérotype de réovirus (globuleuses, filamenteuses ou granuleuses) (Dermody et al., 2013).



**Figure 2.** Cycle de réplication de réovirus (Adaptée de Lemay, 2018)

## 1.4 Épidémiologie et Pathogénicité

Tel que précédemment mentionné, le réovirus n'est, à priori, pas pathogène pour les humains en bonne santé qui possèdent un système immunitaire en bonne condition. Il est estimé, toutefois, que l'exposition au réovirus soit un phénomène assez courant. Ainsi près de 100% des adultes possèdent des anticorps contre réovirus, résultat d'infections antérieures souvent peu symptomatiques voire même asymptomatiques (Minuk et al., 1985; Tai et al., 2005). Cette très forte séroprévalence dans la population témoigne clairement de l'importante ubiquité du virus et de sa faible pathogénicité. Par contre, tel que son nom l'indique, réovirus (*respiratory enteric orphan virus*) peut parfois occasionner des symptômes communément associés au rhume, à la grippe ou encore à une gastroentérite mineure (Jackson and Muldoon, 1973; Rosen et al., 1963). À noter que chez les jeunes enfants, réovirus peut également infecter le système nerveux central et causer quelques rares cas de méningites (Tyler et al., 2004).

Chez la souris immunodéficente, les études ont montré que les effets pathogéniques d'une infection par réovirus peuvent être bien plus graves et parfois même mortels (King et al., 2011). Le neurotropisme de réovirus suite à une infection via le tractus respiratoire ou gastro-intestinal est une propriété vastement étudiée. Il a d'ailleurs été découvert qu'au niveau du système nerveux central de la souris, le réovirus se lie au récepteur NgR1, ce qui lui confère la capacité d'infecter les cellules neuronales (Konopka-Anstadt et al., 2014). Une étude récente réalisée avec des souris néo-natales montre que la susceptibilité des souris à l'encéphalite par réovirus diminue après 1 semaine de vie. Cette même étude montre d'ailleurs que la mortalité observée en fonction de l'âge est associée au développement et à la maturation de la réponse interféron de type 1 chez ces souris (Wu et al., 2018).

Les études menées sur les souris permettent également de découvrir des implications insoupçonnées du réovirus au niveau de maladie auto-immune. C'est d'ailleurs le cas d'une importante étude concernant la maladie cœliaque dans laquelle les chercheurs ont utilisé deux sérotypes de réovirus (T1L et T3D) à titre de modèle infectieux. Il a été montré que l'infection par réovirus, de par son activation de la voie interféron, pouvait altérer l'homéostasie intestinale en promouvant une immunité  $T_H1$  contre les antigènes alimentaires. Les patients souffrant de la maladie cœliaque présentaient aussi des taux d'anticorps anti-réovirus plus élevés que les patients sains (Bouziat et al., 2017).

Ce ne sont ici que quelques exemples parmi tant d'autres qui démontrent que ce virus est un outil de choix dans l'étude de la pathogénicité virale et de la réponse immunitaire de l'hôte. Cependant, outre le fait qu'il soit un modèle utilisé dans l'étude de tels mécanismes fondamentaux, réovirus intéresse également les chercheurs grâce à son activité naturellement oncolytique et à son utilisation potentielle dans le traitement du cancer.

## **1.5 Activité oncolytique**

Bien que les premières évidences selon lesquelles des agents viraux permettraient de combattre le cancer aient été observées au début des années 1900, ce n'est que depuis une vingtaine d'années seulement que le concept de virothérapie est plus vastement étudié (Sinkovics and Horvath, 2008). Aujourd'hui, les connaissances scientifiques et les techniques

moléculaires avancées nous permettent de manipuler les virus et de facilement modifier leur génome afin d'en faire des alliés dans la lutte au cancer.

### 1.5.1 Généralités

Les cellules en bonne santé sont dotées de mécanismes de défense qui leur permettent d'empêcher la propagation et la multiplication de virus, tel que l'inhibition de la synthèse protéique, l'apoptose ou encore la production d'interféron. Or, il s'avère que chez les cellules qui ont subi beaucoup de mutations et qui sont devenues cancéreuses, ces mécanismes sont souvent affaiblis voire même abolis (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011; Stojdl et al., 2000) . Plusieurs types de virus en tirent avantage et s'y répliquent donc de meilleure façon.

Plusieurs virus sont aujourd'hui de très bons candidats pour une éventuelle utilisation dans le traitement du cancer. Le défi que tentent maintenant de relever les chercheurs est celui d'améliorer le potentiel oncolytique des différents virus à l'étude, tout en s'assurant de leur innocuité. Parmi la liste des candidats, on retrouve des virus qui sont naturellement oncolytiques comme le réovirus de mammifères, le virus de New Castle ou encore le Parvovirus H-1. Il y a aussi des virus qui doivent être, au préalable, génétiquement modifiés en laboratoire. Ces manipulations génétiques ont pour but de rendre ces virus sécuritaires, et donc non pathogènes pour l'hôte à traiter. On ajoute même à certains virus des gènes supplémentaires afin d'améliorer leur potentiel oncolytique. Dans cette catégorie, on retrouve des virus tels que le virus de la stomatite vésiculaire (VSV), le virus de la vaccine (VV), le virus de la rougeole, l'adénovirus, le virus maraba et le virus de l'herpès simplex (HSV), pour ne faire mention que de ceux-ci (Russell et al., 2012). La très vaste majorité de ces virus oncolytiques sont présentement le sujet de nombreux essais cliniques à travers le monde (Fountzilias et al., 2017).

En 2005, la Chine a approuvé le virus H101, plus communément appelé Oncorine, utilisé notamment pour le traitement de cancers de la tête et du cou, des poumons et du foie. Il s'agit d'un adénovirus recombinant délété du gène E1B, ce qui lui confère une meilleure répllication dans les cellules cancéreuses déficientes en p53 (Garber, 2006). Plus récemment, la FDA « Food and Drug Administration » a approuvé le virus Talimogene laherparepvec (T-VEC) comme traitement des mélanomes aux États-Unis. Il s'agit d'un virus herpès simplex délété des gènes



ICP34.5 et ICP47, mais exprimant du GM-CSF « Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor » (Pol et al., 2016).

## **1.5.2 Réovirus, un virus naturellement oncolytique**

Tel que mentionné dans la section 1.4, le réovirus permet d'étudier les mécanismes fondamentaux impliqués dans les relations virus-hôtes. Cependant, l'intérêt scientifique envers le réovirus est également justifié par le fait qu'il s'agit d'un virus naturellement oncolytique. En effet, à la fin du XXe siècle, des chercheurs ont découvert que réovirus se répliquait mieux dans les cellules cancéreuses, particulièrement celles transformées par l'oncogène ras, et détruisait celles-ci de manière préférentielle par rapport aux cellules saines (Coffey et al., 1998). Les hypothèses qui tentent d'expliquer cette activité oncolytique naturelle sont nombreuses, mais la compréhension entourant ce phénomène demeure incomplète (Phillips et al., 2018a).

### **1.5.2.1 Importance de l'oncogène Ras dans l'activité oncolytique de réovirus**

La protéine Ras est une GTPase ayant une grande importance dans le bon fonctionnement des cellules, puisqu'elle régule plusieurs voies de signalisation impliquées dans la survie et la croissance cellulaire (Malumbres and Barbacid, 2003; Malumbres and Pellicer, 1998). Elle fut d'ailleurs nommée suite à des études sur le sarcome du rat (*rat sarcoma*). La liaison de la protéine Ras au GDP ou au GTP est respectivement régulée par des protéines activatrices de GTPases (GAP) et des facteurs d'échange de nucléotides guanyliques (GEF). Lorsqu'elle est couplée au GTP, la protéine Ras est active puisqu'elle peut alors se lier à des protéines effectrices, ce qui permettra le déclenchement de différentes cascades de signalisation régulant notamment la progression du cycle cellulaire, la différenciation ou encore l'apoptose. À noter que la mutation RasV12 rend la protéine insensible aux GAP, ce qui fait en sorte que Ras est toujours liée au GTP et se retrouve donc, par le fait même, constitutivement sous sa forme activée. L'activation constitutive de Ras peut être à l'origine de cancers. En effet, agissant sur ses effecteurs situés en aval, la protéine Ras-GTP active différentes voies de signalisation telles que la voie RAF/MEK1/2/Erk1/2 impliquée dans la transcription, la prolifération et l'apoptose. On retrouve aussi la voie PI3K/PDK1/Akt qui agit sur le métabolisme, la survie et la régulation du cycle cellulaire (Pylayeva-Gupta et al., 2011).

Les études permettent d'estimer que chez environ la moitié de tous les cancers, on retrouve la protéine Ras activée de manière constitutive, ce qui favorise indéniablement le processus de transformation cellulaire (Prior et al., 2012). Les premières études liant Ras et réovirus montraient que les cellules NIH-3T3 (fibroblastes de souris) étaient résistantes à l'infection alors que les cellules NIH-3T3 transformées par l'oncogène ras permettaient une meilleure répllication virale (Strong et al., 1998). Bien que les raisons exactes ne soient pas claires, une diminution de la réponse interféron dans les cellules NIH-Ras ainsi que des étapes de répllication virale facilitées pourraient expliquer la meilleure infectivité de réovirus dans ces cellules. En effet, des études ont montré que la transformation des cellules par Ras favorise différentes étapes dans le cycle de répllication de réovirus. Ainsi, ces cellules décapsident le virus 3 fois mieux que les cellules parentales et produisent des virions plus infectieux qui sont relâchés plus facilement (Marcato et al., 2007). Il a également été montré que la production d'interféron est inhibée chez des cellules transformées par Ras. En effet, on observe dans ces cellules qu'une voie de signalisation contrôlée par Ras empêche la reconnaissance de l'ARN bicaténaire viral via une régulation négative du senseur de virus RIG-I (Shmulevitz et al., 2010). À noter que les notions entourant les senseurs de virus ainsi que les voies de signalisation reliées à l'interféron seront discutés plus en détail à la section 2.1.

#### **1.5.2.2 Essais cliniques avec Reolysin®**

La compagnie Oncolytics, basée à Calgary, réalise depuis 2003 des essais cliniques avec un réovirus de type 3 non modifié, nommé Reolysin®. Souvent administré conjointement avec une thérapie anti-cancer conventionnelle, Reolysin® est présentement à l'étude pour le traitement de plusieurs types de cancer ; myélome multiple, cancer du sein, du poumon, du pancréas, de la prostate, de la tête et du cou, pour ne nommer que ceux-là (ClinicalTrials.gov., 2018a). Parmi les essais cliniques les plus avancés, on retrouve une étude dont la phase III a été complétée en 2014 chez des patients souffrant de cancer au niveau de la tête et du cou. L'administration conjointe chez ces patients d'un médicament chimiothérapeutique (Paclitaxel ou Carboplatin) et de Reolysin® a montré des résultats plutôt encourageants avec une amélioration du taux de survie significative (ClinicalTrials.gov., 2014). Plus récemment en 2017, la phase 2 d'un essai clinique consistant à administrer le médicament Paclitaxel et Reolysin® chez des patientes atteintes de cancer du sein métastatique, a été complétée

(ClinicalTrials.gov., 2018b). D'autres études cliniques vérifiant l'efficacité de Reolysin® dans des contextes de myélomes multiples ou encore de cancers du pancréas sont présentement en phase I ou II (Oncolytics Biotech Inc., 2018).

### **1.5.3 Avantages et limites**

Les thérapies conventionnelles utilisées pour traiter le cancer, comme la chimiothérapie et la radiothérapie, peuvent s'avérer très efficaces chez certains patients. Par contre, leur manque de spécificité envers les cellules cancéreuses pose problème et peut engendrer des effets secondaires importants. Grâce aux avancées réalisées dans le champ de la virothérapie, les virus oncolytiques sont en voie de devenir de précieux ajouts dans l'arsenal thérapeutique contre le cancer (Fountzilias et al., 2017). Certains virus ont l'avantage d'être relativement faciles à manipuler génétiquement, ce qui permet d'en faire des microorganismes spécialement conçus pour s'attaquer aux cellules cancéreuses. L'avantage principal de la virothérapie réside dans le fait qu'il s'agit d'un traitement ciblé et spécifique. En effet, les virus oncolytiques vont se répliquer de manière sélective dans les cellules cancéreuses et les nouvelles particules virales qui seront produites permettront l'infection des cellules avoisinantes. De manière intéressante, il est possible d'ajouter des gènes aux virus pour qu'ils expriment des produits toxiques, tel que du TNF $\alpha$ , ou encore qui favorisent le recrutement du système immunitaire au site tumoral, comme du GM-CSF (Beug et al., 2018; Fukuhara et al., 2016). À noter que la lyse des cellules cancéreuses par les virus peut provoquer la libération d'antigènes tumoraux permettant d'attirer également le système immunitaire au site de la tumeur (Howells et al., 2017). Tel que mentionné dans la section précédente, les virus oncolytiques peuvent être administrés de pair avec des traitements plus conventionnels, ce qui semble donner des résultats d'efficacité synergiques. Les symptômes associés à la virothérapie s'apparentent généralement à ceux d'une grippe, soit de la fièvre, des maux de tête, de la fatigue et parfois de troubles hépatiques. Ces symptômes sont évidemment considérés plus tolérables que les effets secondaires occasionnés par la chimiothérapie ou la radiothérapie (nausées, diarrhées, anémie, perte de cheveux, etc) (Pol et al., 2011).

D'autre part, le concept de virothérapie comporte aussi son lot de défis. Par exemple, la propagation d'un virus jusqu'au sein d'une tumeur est un élément qui peut causer problème. En

effet, le virus, transporté par le flux sanguin, peut être neutralisé par des anticorps ou par le complément avant d'atteindre sa cible. Il peut également être séquestré et éliminé par des organes tels que le foie ou les reins. Sans oublier le fait que les tumeurs sont majoritairement des environnements hypoxiques et faiblement vascularisés, ce qui les rend plus difficiles d'accès (Russell et al., 2012; Sze et al., 2013). Finalement, le concept de virothérapie peut se buter à l'opinion publique, potentiellement réfractaire à l'idée que des patients cancéreux soient inoculés avec des virus infectieux. Évidemment, les virus utilisés dans ce genre de traitement sont manipulés afin d'être non pathogènes pour l'humain. La sécurité des patients est et restera toujours un enjeu primordial dans cette approche thérapeutique. Le tableau ci-dessous résume les avantages et les limites possibles des virus oncolytiques.

**Tableau II.** Avantages et limites de la virothérapie

Avantages	Limites
Réplication virale sélective dans les cellules tumorales Les cellules saines sont non endommagées	Le virus peuvent être éliminé par le système immunitaire ou séquestré par certains organes avant d'atteindre sa cible
Possibilité de modifier le virus pour qu'il exprime des cytokines au site de la tumeur (ex : TNF $\alpha$ , GM-CSF)	Certains types de cellules tumorales peuvent être résistantes à l'infection
Effet potentialisateur : les nouvelles particules virales relâchées agiront sur les cellules avoisinantes	Certaines tumeurs sont difficiles d'accès (environnement peu vascularisé, hypoxique)
Double action : lyse directe des cellules tumorales et effets anticancéreux médiés par le recrutement du système immunitaire au site de la tumeur	Inquiétudes par rapport à la sécurité et à l'éthique
Possibles interactions synergiques lorsque combiné avec des traitements conventionnels	
Effets secondaires considérablement moindres par rapports aux traitements conventionnels	

## 2 Interféron

Le rôle de la réponse interféron (IFN) dans la pathogenèse de réovirus a fait l'objet de nombreuses études dans les dernières années. En effet, plusieurs données s'accumulent sur la vraisemblable implication de la réponse IFN au sein de modèles animaux et ce, dans un contexte d'infection aiguë du myocarde ou encore du système nerveux central (Azzam-Smoak et al., 2002; Knowlton et al., 2012; Samuel, 1998; Schittone et al., 2012; Sherry et al., 1998). De manière intéressante, les études révèlent de plus en plus que la réponse IFN pourrait également être en lien avec l'oncotropisme de réovirus, avec l'émergence de souches potentiellement pathogènes, et avoir un rôle à jouer dans une maladie chronique humaine impliquant potentiellement réovirus, la maladie céliaque (Bouziat et al., 2017; Rudd and Lemay, 2005; Sandekian et al., 2013; Shmulevitz et al., 2010). Dans cette section, nous discuterons donc de l'important mécanisme d'immunité inné qu'est l'IFN de type 1 lors d'une infection virale, pour ensuite plus précisément s'attarder à son importance dans le contexte de réovirus.

### 2.1 Mécanisme général de la réponse antivirale IFN

Bien que les virus présentent des différences au niveau génomique et des modes de réplication variables, les cellules sont munies de mécanismes d'immunité innée qui leur permettent d'établir une première défense envers une vaste gamme d'infections virales. La voie de signalisation reliée à l'IFN de type 1 ( $\beta$  et  $\alpha$ ) est un exemple d'un tel mécanisme, assurant un moyen rapide de défense envers différents virus. Les composants cellulaires de cette immunité innée vont notamment être en mesure de lier certains PAMPs, (*Pathogen Associated Molecular Patterns*), composés majoritairement d'ADN ou d'ARN. Certains motifs contenus dans ces acides nucléiques étrangers permettent à la cellule de les reconnaître et de les catégoriser comme étant un signal de danger. En effet, lors d'une infection, le génome du virus, ses intermédiaires de réplication ou encore ses transcrits d'ARN peuvent être reconnus et détectés par des récepteurs à l'intérieur des cellules, appelés PRR (*Pattern recognition receptors*) (Thompson et al., 2011). Dès lors, ce processus de reconnaissance déclenche l'activation de voies de signalisation intracellulaires, activant ainsi la transcription des gènes des IFNs, qui sont ensuite sécrétés pour aller agir sur leur récepteur à la surface des cellules. La liaison des IFNs au

récepteur permet dans un deuxième temps l'activation de cascades de signalisation qui activent la transcription d'ISGs (*Interferon stimulated genes*), codant pour des protéines aux propriétés antivirales. Ce processus d'immunité inné équivaut à la première ligne de défense contre les infections, et contribue à la mise en place de l'immunité adaptative et spécifique.

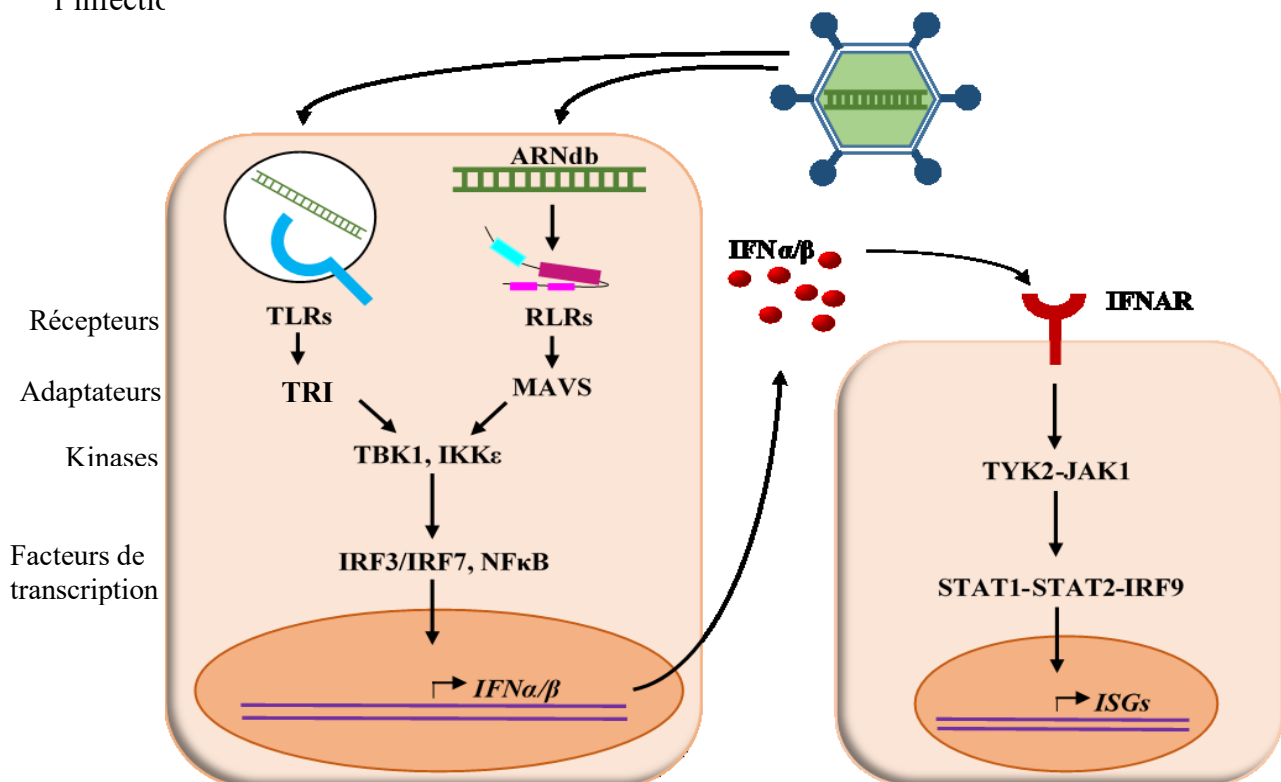
### 2.1.1 Réovirus et les voies de signalisation reliées à l'IFN

Selon son mode d'entrée dans la cellule, le matériel génétique du réovirus de mammifères peut être reconnu par divers composants du système immunitaire inné associé à l'IFN. Tel qu'illustré à la **figure 3**, son génome pourra être reconnu à l'intérieur des endosomes par les TLR3 (*Toll-like-receptors-3*) (Alexopoulou et al., 2001). Au niveau cytoplasmique, l'ARN viral peut également être détecté par des RLRs (*RIG-I-like-receptors*). Pour sa part, le génome de réovirus active les hélicases RIG-I (*retinoic-acid-inducible protein 1*) et MDA5 (*melanoma-differentiation-associated gene 5*). En effet, une étude a montré que l'infection par différentes souches de réovirus menait à l'expression d'ISGs et ce, même dans des cellules RIG-I<sup>-/-</sup> ou MDA5<sup>-/-</sup>. Toutefois, l'absence ou la très faible expression de ces ISGs dans des cellules double knockout infectées, malgré qu'on y observe une forte réplication virale, indique qu'il s'agit des deux récepteurs principaux qui permettent l'établissement d'une réponse immune innée cellulaire (Loo et al., 2008).

Alors que la structure moléculaire des ligands qui permettent l'activation de MDA5 est encore mal définie, des études ont montré que RIG-I est activé en reconnaissant des ARNs comportant des extrémités 5'di/triphosphate libres (Goubau et al., 2014; Hornung et al., 2006; Pichlmair et al., 2006; Plumet et al., 2007). Il a également été observé que la longueur des ARNs bicaténaires viraux avait un impact sur l'activation de ces deux récepteurs. En effet, RIG-I reconnaît préférentiellement de courts ARNs alors que MDA5 se lie de manière plus sélective aux longs ARNs (Kato et al., 2008).

Une fois activés, ces différents récepteurs transmettent le signal via une protéine adaptatrice différente. En effet, l'activation de TLR3 entrainera le recrutement de la protéine adaptatrice TRIF alors que les RLRs recruteront la protéine MAVS (aussi appelée IPS-1, CARDIF, VISA ou NF-kappa-B-activating protein 031N) (Loo et al., 2008; Odendall and Kagan, 2017; Takeuchi and Akira, 2009). Ces événements au sein de la cellule provoque

l'activation des kinases TBK1 et IKK qui pourront alors phosphoryler le facteur de transcription IRF3. La phosphorylation d'IRF3 provoque sa dimérisation, ce qui permet son entrée dans le noyau de la cellule afin d'aller induire la transcription d'IFN de type 1. Les IFNs  $\beta$  et  $\alpha$  agissent de façon autocrine et paracrine. C'est donc dire que l'IFN initialement produit par la cellule aura un effet non seulement sur les cellules avoisinantes, mais aussi sur la cellule même qui a produit cet IFN. Les molécules d'IFN se lient aux récepteurs IFNAR situés à la surface des cellules, activant ainsi des kinases intracellulaires appelées TYK2-JAK1. Cette voie de signalisation entraîne la phosphorylation de STAT1 et STAT2 qui forment ensuite un hétérodimère capable d'interagir avec IRF9 pour former le complexe ISGF3 (*IFN-stimulated gene factor 3*). Ce complexe est ensuite transloqué au noyau pour aller lier les ISRE (*IFN-I-stimulated response element*), entraînant l'activation et la transcription de plus de 300 gènes appelés ISGs (Chattopadhyay and Sen, 2014). Ce sont ces gènes à proprement dit qui codent pour des protéines aux propriétés antivirales et immunorégulatrices, qui permettront de limiter l'infectic



**Figure 3.** Voies de signalisation menant à l'induction d'IFN de type 1 et à la synthèse d'ISGs suite à une infection virale par réovirus (Inspirée de Radcliffe Department of Medicine, 2018)

## 2.2 Effets antiviraux de différents ISGs

Les ISGs, ou plutôt leurs produits, exercent de nombreuses activités antivirales au sein de la cellule lorsque celle-ci est infectée par un virus. À noter qu'à ce jour, plusieurs de ces actions antivirales demeurent encore méconnues et non pleinement décrites. Différentes études sont donc toujours menées afin d'approfondir les connaissances sur le fonctionnement de ces gènes. Dans cette section, nous effectuerons un bref aperçu des mécanismes d'action exploités par des ISGs connus pour limiter et contenir une infection par réovirus.

Tout d'abord, un ISG fortement induit par la réponse IFN est l'ISG15. La structure d'ISG15 est homologue à celle d'une ubiquitine (Loeb and Haas, 1992). Malgré cela, il ne semble pas qu'ISG15 induise une dégradation de ses substrats par le protéasome. En fait, son activité antivirale, appelée « *ISGylation* », exercerait une fonction d'interférence au sein du système d'ubiquitines de la cellule (Fan et al., 2015; Okumura et al., 2008; Takeuchi and Yokosawa, 2005). Il a été montré qu'une surexpression d'ISG15 dans des cellules diminue le taux de réplication de réovirus et que son absence dans des cellules ISG15<sup>-/-</sup> entraîne une augmentation de la réplication virale (Tian et al., 2015).

On retrouve également les ISGs OAS et RNase L, qui agissent de manière séquentielle afin de limiter l'infection virale. OAS est exprimé à de faibles niveaux constitutifs au sein de la cellule et sa transcription est fortement induite par l'IFN de type 1. Dans un contexte d'infection, des monomères inactifs d'OAS s'accumulent dans le cytoplasme. Au contact d'ARN bicaténaire viral, OAS se polymérise et transforme l'ATP en 2'-5'A (Hovanessian and Justesen, 2007; Kerr et al., 1977). Les oligomères 2'-5'A vont par la suite se lier aux monomères de RNase L, entraînant leur dimérisation. Les dimères de RNase L, maintenant actifs, vont cliver tous les ARNs monocaténaux viraux et cellulaires (Chakrabarti et al., 2011; Clemens and Vaquero, 1978). De manière intéressante, une récente étude montre que parmi les isoformes d'OAS1/2/3, ce serait OAS3 qui serait requis pour activer RNase L (Li et al., 2016). Les ARNs dégradés par RNase L vont agir comme des PAMPs pour les PRRs cytoplasmiques tels que RIG-I et MDA5 afin de promouvoir l'induction d'IFN (Malathi et al., 2007). En ce qui concerne réovirus, il a déjà été démontré que, lors de l'infection de cellules humaines, on retrouve la présence d'oligomères 2'-5'A ainsi que d'ARNs supposément clivés par RNase L (Nilsen et al., 1982).

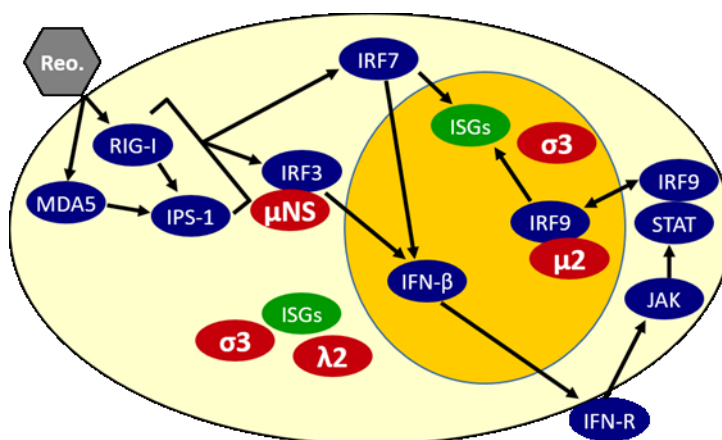


On retrouve également l'ISG EIF2AK2 qui produit la protéine PKR (*protein kinase R*), un des premiers effecteurs antiviral à avoir été décrit et qui est, à ce jour, un des mieux caractérisés. La protéine PKR est constitutivement produite dans la cellule, mais elle est également induite par la présence d'IFN de type 1, dû à la présence d'un ISRE à l'intérieur de son promoteur. Elle est initialement sous forme de monomère dans le cytoplasme, mais au contact d'ARN viral bicaténaire comme le génome de réovirus, elle se dimérise puis s'active par autophosphorylation. Le complexe dimérique peut donc alors phosphoryler le facteur eIF2 $\alpha$  (*eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$* ), ce qui a pour conséquence d'inhiber la traduction protéique au sein de la cellule (Lemaire et al., 2008; Toth et al., 2006).

Une étude a démontré que, dans un contexte d'infection à réovirus, PKR contribue en effet à l'arrêt de traduction des protéines chez l'hôte, mais que ce ne serait pas le seul responsable de ce phénomène. Il semblerait que RNase L soit aussi requis dans cette régulation négative de la synthèse des protéines virales et cellulaires (Smith et al., 2005). Finalement, de nombreux virus évoluent pour développer des stratégies moléculaires qui leur permettent d'échapper, voire même parfois de tirer profit de certains des composants de la voie reliée à l'IFN. De ce fait, il a été remarqué que PKR et RNase L n'exercent pas de fonctions antivirales envers certaines souches de réovirus. En fait, certaines des souches se répliquent même mieux dans des cellules exprimant PKR et RNase L que dans des cellules qui n'expriment pas ces ISGs (Smith et al., 2005). Ceci prouve bien que réovirus ne fait pas exception à la règle et que, tout comme beaucoup d'autres virus, il est en mesure de contourner certaines défenses immunitaires mises en place par les cellules hôtes.

## 2.3 Mécanismes viraux inhibiteurs de la voie IFN chez réovirus

Concentrons-nous maintenant sur l'interaction de réovirus avec certains composants de la voie de signalisation reliée à l'IFN. À ce jour, on observe que plusieurs de ses protéines virales semblent être impliquées soit dans le contrôle de l'induction d'IFN ou soit au niveau de la sensibilité du réovirus à cette réponse immune. Ici sont présentées des protéines de réovirus dont l'implication dans l'un ou l'autre de ces aspects est claire. Alors que pour certaines d'entre elles le mode de fonctionnement est relativement bien décrit, pour les autres des études subséquentes seront nécessaires afin de confirmer leur mécanisme d'action.



**Figure 4.** Protéines de réovirus (rouge) connues pour avoir un rôle antagoniste dans la voie IFN. (Adaptée de Sherry, 2009)

### 2.3.1 La protéine $\sigma 3$

La protéine  $\sigma 3$  (codée par le gène S4), constituant de la capsid externe, est bien connue pour avoir un rôle dans la sensibilité du virus à l'IFN. Cette protéine possède la capacité de lier et de séquestrer l'ARN bicaténaire. Ceci empêche donc la reconnaissance du matériel génétique viral par PKR, permettant au virus de continuer la traduction de ses protéines au sein de la cellule infectée. Un domaine de 85 acides aminés dans la portion C-terminal de la protéine a été identifié comme étant responsable de sa liaison aux ARNs viraux. De manière intéressante, ce motif est composé d'acides aminés basiques répétés et il est conservé au niveau des sérotypes 1, 2 et 3 de réovirus (Mabrouk et al., 1995; Miller and Samuel, 1992). La protéine  $\sigma 3$  s'associe également avec  $\mu 1$ , une autre protéine de la capsid externe afin de former un hétérohexamère

(Liemann et al., 2002). Lorsqu'elles sont assemblées,  $\sigma 3$  et  $\mu 1$  assurent la stabilité structurale de la particule virale. À noter que les liaisons de  $\sigma 3$  aux ARNs et à  $\mu 1$  semblent être des événements mutuellement exclusifs (Bergeron et al., 1998; Huismans and Joklik, 1976). Lors d'une infection, on observe des niveaux stables de  $\sigma 3$  et le déclin des quantités d'ARN bicaténaire qui lui sont associés. Cela permet de suggérer un modèle selon lequel, tôt dans l'infection, le rôle de  $\sigma 3$  consisterait à inhiber l'activation de PKR en liant les ARNs bicaténaires pour éventuellement s'associer de plus en plus avec  $\mu 1$  en vue de la formation des capsides externes des nouveaux virions (Yue and Shatkin, 1997).

### **2.3.2 La protéine $\mu 2$**

Il a été montré que la protéine  $\mu 2$  (codée par le gène M1), qui se retrouve au niveau de la capside interne, est aussi un élément important dans le contrôle de l'induction de la réponse IFN. En effet,  $\mu 2$  est capable d'altérer la localisation cytoplasmique du facteur IRF9 en induisant une accumulation inhabituelle de ce dernier dans le noyau de la cellule (Zurney et al., 2009). Cela a pour conséquence de diminuer considérablement la synthèse d'ISGs, puisqu'IRF9 est alors indisponible pour former le complexe hétérotrimérique ISGF3. De manière plus précise, cette capacité à séquestrer IRF9 au noyau est attribuée à la présence d'un acide aminé particulier situé en position 208 de la protéine  $\mu 2$  (Irvin et al., 2012). En effet, lorsqu'on retrouve une proline en position 208, comme c'est le cas chez la souche T1L, la protéine  $\mu 2$  est très stable et est alors capable de retenir IRF9 au noyau, freinant ainsi le processus inductible menant à la synthèse d'ISGs. Au contraire, chez la souche T3D, c'est l'acide aminé sérine qui est généralement retrouvée en position 208 dans la protéine  $\mu 2$ , rendant cette dernière plus instable. Ceci l'empêche d'agir sur IRF9, entraînant ainsi une plus grande induction d'IFN chez les cellules infectées, puisque la formation du complexe ISGF3 n'est pas entravée.

### **2.3.3 La protéine $\mu NS$**

La protéine non-structurale  $\mu NS$  (codée par le gène M3) de réovirus est nécessaire et suffisante pour la formation des inclusions virales, soit l'équivalent de petites usines au sein de la cellule à l'intérieur desquelles le virus peut répliquer son génome et assembler les nouveaux virions (Becker et al., 2003; Broering et al., 2004; Broering et al., 2002). Une étude a récemment

mis en lumière un mécanisme par lequel la protéine  $\mu$ NS aide réovirus à déjouer le système immunitaire inné de la cellule. En effet, lors de l'infection, le facteur de transcription IRF3 serait séquestré dans les inclusions virales au niveau du cytoplasme, plutôt que d'être transloqué au noyau, interférant ainsi avec les niveaux d'IFN produit par la cellule. La séquestration d'IRF3 serait directement liée à la capacité de la protéine virale  $\mu$ NS à former ces inclusions virales. Chez des cellules infectées par des virus dont la protéine  $\mu$ NS a été tronquée ou mutée pour inhiber la formation des inclusions virales, on remarque une proportion significativement plus importante d'IRF3 localisé au noyau, promouvant ainsi la production d'IFN et l'activation des voies de signalisation menant à la synthèse des ISGs (Stanifer et al., 2017).

### **2.3.4 La protéine $\lambda$ 2**

La protéine  $\lambda$ 2 (codée par le gène L2) est grandement impliquée dans la formation de la capsid externe. Celle-ci compose les tourelles « transcapsidiques », structures cylindriques permettant l'ancrage de  $\sigma$ 1 sur la particule virale. Malgré ce rôle structural non négligeable, la fonction de  $\lambda$ 2 est principalement enzymatique. En effet, cette protéine possède à la fois une activité de guanylyltransférase, mais aussi de méthyltransférase 1 et 2 (Bujnicki and Rychlewski, 2001; Luongo et al., 2000 ; Nibert et al., 1996). Ces fonctions enzymatiques assurent l'assemblage d'une structure coiffe en 5' des ARNs messagers viraux. Une première étude a soulevé que  $\lambda$ 2 était associée à une sensibilité à l'IFN accrue dans des cellules de myocarde (Sherry et al., 1998). Plus récemment, l'utilisation des techniques de génétique inverse a permis d'établir que le phénotype de sensibilité à l'IFN observé chez un mutant de réovirus était dû à une mutation ponctuelle dans la protéine  $\lambda$ 2 (Sandekian and Lemay, 2015b). Cette mutation étant située dans un domaine méthyltransférase, l'hypothèse veut que cette fonction enzymatique soit altérée chez ce mutant, l'empêchant de coiffer adéquatement les ARNs messagers viraux. Ceux-ci seraient donc mieux détectés par la cellule, ce qui expliquerait les plus faibles niveaux de réplication observés chez ce mutant en présence d'IFN. Des études ultérieures seront nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

### **3 Sélection de mutants de réovirus sensibles à l'IFN**

La création de mutants est une approche incontournable pour étudier et approfondir nos connaissances sur le rôle que peuvent avoir les différentes protéines de réovirus. Pour ce faire, des approches dites classiques sont encore utilisées de nos jours afin de modifier génétiquement réovirus. Dans les dernières années, des mutants hypersensibles à l'IFN ont été obtenus dans notre laboratoire par mutagenèse chimique et par persistance virale.

#### **3.1 Mutagenèse chimique et le mutant P4L-12**

La mutagenèse chimique est une méthode classiquement utilisée afin d'obtenir des virus résistants à des agents chimiques donnés (Fields and Joklik, 1969; Ikegami and Gomatos, 1968; Patrick et al., 2001). En 2005, un mutant créé par mutagenèse chimique a été obtenu au laboratoire. En effet, le réovirus sauvage du laboratoire, appelé T3D<sup>s</sup>, a été soumis à des traitements de NTG (nitrosoguanidine) et suite à des passages répétés, il a été possible d'isoler un mutant nommé P4L-12.

Suite aux premières analyses impliquant P4L-12, il fut possible d'observer une sensibilité à l'IFN beaucoup plus importante chez ce mutant que chez le réovirus sauvage T3D<sup>s</sup> duquel il découlait. Suite au séquençage, des mutations ont été trouvées dans 4 protéines de P4L-12, soient  $\lambda 2$ ,  $\mu 1$ ,  $\mu NS$ , et  $\sigma 3$  (Rudd and Lemay, 2005).

Grâce à la technique de génétique inverse, il a été trouvé que la simple substitution de l'acide aminé thréonine pour une méthionine en position 636 dans la protéine  $\lambda 2$  était responsable du phénotype de sensibilité accrue observé chez le mutant (Sandekian and Lemay, 2015b). Cette mutation se trouve dans un domaine méthyltransférase de la protéine  $\lambda 2$ , ce qui permet d'émettre l'hypothèse selon laquelle la 2'O méthylation en 5' des ARNs messagers viraux serait altérée et peut-être effectuée de manière inefficace lors d'une infection par P4L-12. Le virus P4L-12, dont les ARNs seraient incorrectement coiffés, pourrait ainsi être mieux reconnu et inhibé par notamment IFIT1, un ISG dont la synthèse est induite par la présence d'IFN de type 1 (Daffis et al., 2010).

Le mutant P4L-12 a également été testé pour son potentiel à infecter des cellules parentales par rapport à des cellules transformées. En effet, des cellules NIH-3T3 transformées ou non par l'oncogène ras ont été infectées avec P4L-12 et un virus sauvage. Il a été possible d'observer non seulement que P4L-12 infectait plus efficacement les cellules transformées, mais que sa réplication était aussi bloquée de meilleure façon dans les cellules parentales (Rudd and Lemay, 2005). Cette meilleure discrimination entre cellules transformées par ras et celles qui ne le sont pas semble être liée à la sensibilité accrue du virus à l'IFN, sachant que l'oncogène ras activé dérégule considérablement les voies cellulaires reliées à l'IFN (Mundschau and Faller, 1992, 1994; Shmulevitz et al., 2010).

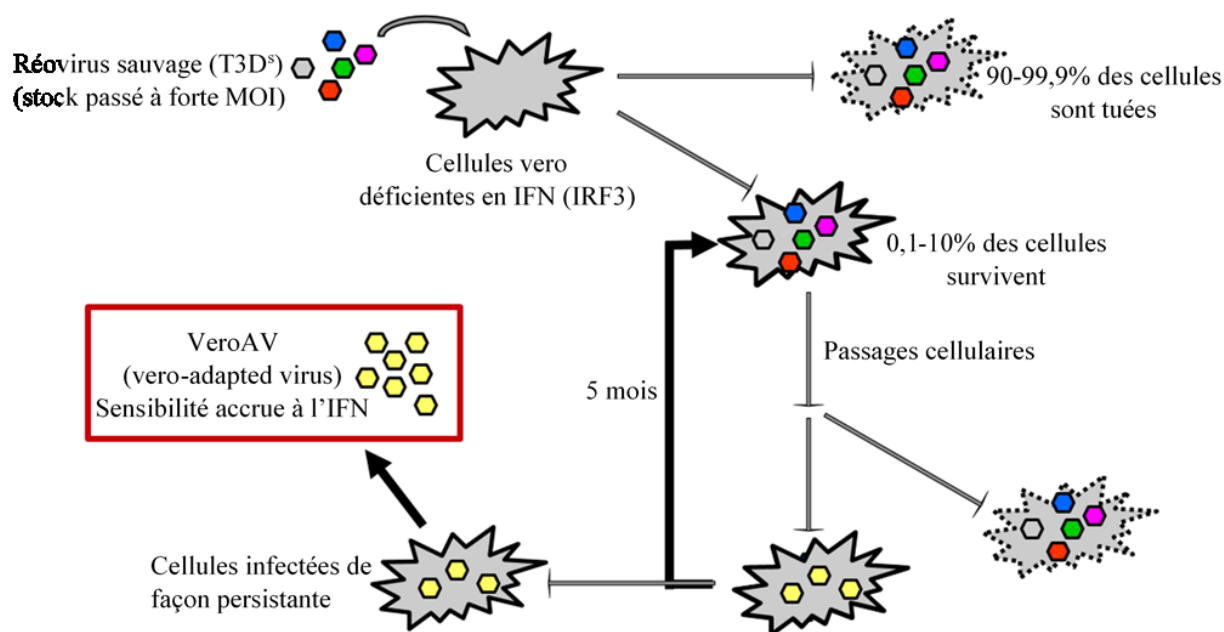
## **3.2 Persistance virale et le mutant VeroAV**

### **3.2.1 Principe**

La persistance virale est une autre méthode classique ayant été utilisée pour modifier le génome de réovirus (Baer and Dermody, 1997; Dermody et al., 1993; Wetzel et al., 1997). L'établissement d'une persistance résulte de la co-évolution virus-cellule, généralement mise en évidence en culture cellulaire. Tel qu'illustré à la **figure 5**, lors d'une infection avec un stock de réovirus comportant des mutants (suite à plusieurs passages à haute multiplicité d'infection), la très grande majorité des cellules vont lyser (~90-99,9%), mais certaines d'entre elles peuvent survivre (~0,1-10%). Ces cellules ne sont donc pas détruites par le virus et vont se mettre à produire et relâcher les particules virales, sans que celles-ci ne lysent les cellules, permettant ainsi plusieurs cycles de réinfections. Au fil du temps, le phénomène de co-évolution fait donc en sorte que les cellules infectées ne meurent pas, et ce grâce à des modifications génétiques qui leur permettent de restreindre certaines étapes du cycle viral. En contrepartie, chez le virus, une telle adaptation provoque l'apparition de mutations qui lui permettent notamment de mieux infecter ces cellules persistantes. À noter que, suite à un traitement par un anticorps antiviral neutralisant, les cellules persistantes peuvent être « guéries » et ne plus produire de virus. À ce moment-là, ces cellules dites « guéries » seront résistantes à l'infection par le réovirus sauvage, mais vont lyser lorsqu'elles seront infectées par le réovirus mutant issu du processus de persistance virale (Lemay, 2016).

### 3.2.2 Obtention du mutant VeroAV

Le phénomène de persistance virale a été récemment exploité dans notre laboratoire afin de générer un nouveau mutant. En effet, notre réovirus de type sauvage (T3D<sup>s</sup>) a été utilisé pour infecter de manière persistante des cellules Vero, ce qui n'avait jamais été fait auparavant. Les cellules Vero ont la particularité de ne pas produire d'IFN, étant notamment déficientes en IRF3, et de ne pas décapsider efficacement le virus dû aux faibles taux de protéases lysosomales qu'elles possèdent (Chew et al., 2009; Emeny and Morgan, 1979; Golden et al., 2002). Après environ 5 mois de co-évolution virus-cellules, l'équipe a réussi à isoler un mutant nommé VeroAV (*Vero-cell-adapted virus*).



**Figure 5.** Processus de persistance virale ayant mené à l'obtention du mutant VeroAV

Suite à l'obtention du mutant VeroAV, un premier séquençage des gènes codant pour les trois protéines de la capsid externe ( $\sigma_3$ ,  $\sigma_1$  et  $\mu_1$ ) a permis de détecter des substitutions d'acides aminés dans les protéines  $\sigma_1$  (Q78P et N198K) et  $\mu_1$  (E89G et A114V) (Jabre et al., 2013).

Les premières études impliquant VeroAV suggèrent que la mutation  $\sigma_1$ -N198K dans laquelle une asparagine (N) non chargée est changée pour une lysine (K) chargée positivement,

est la substitution fortement soupçonnée d'être responsable de la meilleure liaison du virus aux acides sialiques, chargés négativement à la surface des cellules hôtes (Sandekian and Lemay, 2015a). Ces mutations dans la protéine  $\sigma 1$  expliquent donc l'habileté du VeroAV à beaucoup mieux infecter les cellules Vero, surtout lorsqu'elles sont combinées avec d'autres substitutions présentes dans la protéine  $\mu 1$  (E89G et A114V). Ces dernières substitutions résultent en fait d'une co-adaptation entre les protéines de la capsid externe du virus. Les mutations dans la protéine  $\mu 1$  affectent, quant à elles, le désassemblage de la capsid externe chez le virus lors des premières étapes de l'infection (Sandekian and Lemay, 2015a).



## 4 Génétique inverse

Nous nous intéressons brièvement dans cette section à la génétique inverse qui est, depuis quelques années, une méthode de choix dans l'étude du réovirus de mammifères. Il s'agit d'une méthode simple et relativement rapide pour étudier la fonction de gènes, voire même de résidus en particulier, afin de vérifier leur implication au niveau de phénotypes observés. Cette technique est d'ailleurs au cœur des travaux présentés dans le cadre de ce mémoire.

### 4.1 Concept et origine

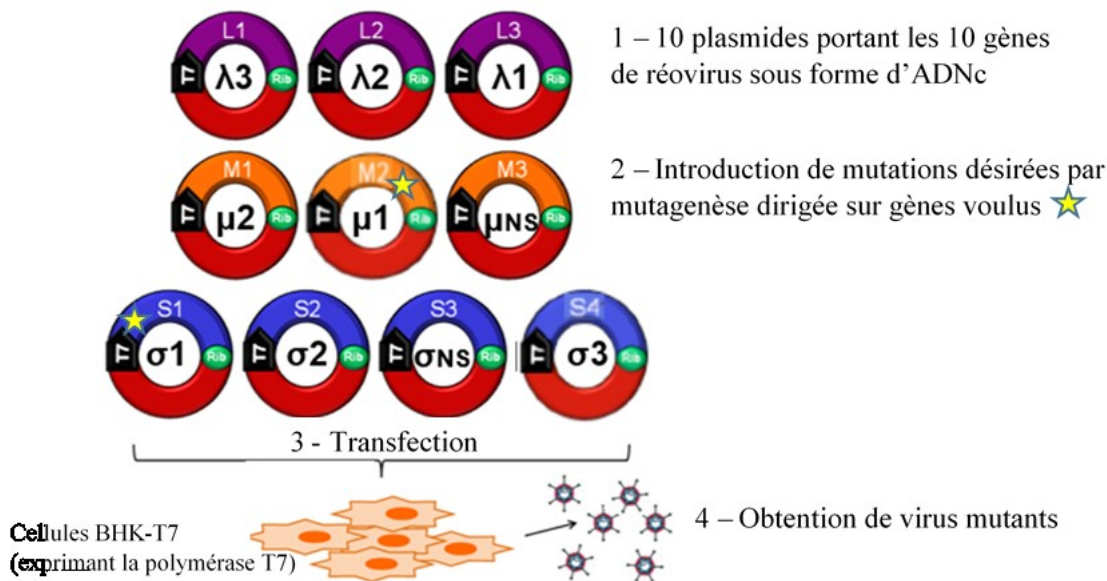
De manière concrète, la génétique inverse consiste à introduire des changements (mutations, insertions, délétions) au niveau du génome pour ensuite en observer les effets (Lemay, 2011). En d'autres mots, il s'agit d'étudier un phénotype associé à un génotype connu. C'est donc tout le contraire de la génétique classique où l'on observe d'abord un phénotype particulier pour ensuite en chercher la cause au niveau génétique.

C'est en 1990 que les premiers travaux relatifs à la mise au point du système de génétique inverse ont été réalisés. À ce moment, on a pu démontrer que l'ARN viral, obtenu après transcription *in vitro*, pouvait être infectieux lorsque transfecté dans des cellules (Roner et al., 1990). Bien que ces expérimentations ne peuvent être qualifiées à proprement dit de « génétique inverse », il s'agissait tout de même des premiers efforts menant à l'élaboration d'un système permettant de manipuler le génome de réovirus à partir de gènes clonés. Quelques années plus tard, une équipe réussit à introduire un segment exogène (gène rapporteur CAT) dans le gène S2 de réovirus, produisant ainsi un ARN chimérique (Roner and Joklik, 2001). La méthode d'introduction de l'ARN dans les cellules était encore fastidieuse, requérant notamment une co-infection avec un virus auxiliaire.

C'est en 2007 que le groupe du laboratoire de Dr Dermody propose un système de génétique inverse dans lequel sont transfectés dix plasmides, codant chacun pour un des dix gènes de réovirus. Chacun des plasmides est construit de la même façon. Le gène cloné est précédé par le promoteur de la polymérase T7 et suivi du ribozyme du virus de l'hépatite D. De cette façon, les ARNs viraux produits possèdent tous les séquences conservées à leurs deux extrémités (5'-GCUA et UCAUC-3'). Dans le système initialement proposé, la transfection des

dix plasmides nécessitait également une co-infection avec un virus de la vaccine exprimant la polymérase T7 (Kobayashi et al., 2007).

Suite à ces progrès majeurs, notre laboratoire fut un des premiers à intégrer le système de génétique inverse aux différents travaux menés à cette époque. Dès lors, notre laboratoire n'utilise pas le virus de la vaccine T7, mais opte plutôt pour l'utilisation d'une lignée cellulaire BHK-21 (*baby hamster kidney*) modifiée pour exprimer constitutivement la polymérase T7. Peu de temps après, le groupe de Dermody publie une mise à jour de leur système, mentionnant que l'utilisation de telles cellules permet de simplifier la procédure, car l'utilisation du virus de la vaccine T7 est évitée (Kobayashi et al., 2010). Cette mise à jour montre aussi la possibilité de combiner les gènes de réovirus sur 4 plasmides au lieu d'avoir 10 plasmides individuels, ce qui augmente l'efficacité de transfection d'environ 10 fois. Cependant, le fait de réduire le nombre de plasmides rend les manipulations plus complexes lorsqu'il est nécessaire d'introduire des mutations sur plusieurs des gènes.



**Figure 6.** Principe du système de génétique inverse utilisant les dix segments de réovirus clonés sur des plasmides.

## 4.2 Derniers développements

Depuis l'avènement du système de génétique inverse, les chercheurs proposent des améliorations qui peuvent être apportées à la procédure initiale. Par exemple, on a mentionné en 2014 qu'il était maintenant possible de transfecter des cellules L929, BHK-21 et A549 en ajoutant un plasmide codant pour la polymérase T7 aux autres plasmides transfectés (Komoto et al., 2014). Aujourd'hui, plusieurs équipes de recherche utilisent un système de génétique inverse et ce, non seulement pour l'étude de réovirus mais aussi pour d'autres virus de la famille des *Reoviridae* tels que le virus bluetongue, le virus de Nelson Bay ou encore le rotavirus (Boyce et al., 2008; Kanai et al., 2017; Kawagishi et al., 2016). Dans le récent système de génétique inverse mis au point pour rotavirus, trois nouveaux plasmides sont transfectés en même temps que tous les autres plasmides codant pour les gènes viraux. Le premier plasmide code pour la protéine FAST, une protéine fusogénique retrouvée chez plusieurs membres de la famille des *Reoviridae* (non présente chez réovirus ni chez rotavirus) qui permet la formation de syncytium au niveau des cellules infectées, promouvant ainsi la réplication virale et la pathogenèse *in vivo*. Les deux autres plasmides codent respectivement pour les sous-unités D1R et D12L de l'enzyme qui synthétise la coiffe des ARNs messagers retrouvée chez le virus de la vaccine. Ceci permet de récupérer davantage de virus infectieux suite à la transfection des BHK-T7, puisque dans le système conventionnel, les premiers transcrits d'ARN messager synthétisés à partir des plasmides transfectés ne semblent pas être coiffés, rendant leur traduction difficile. Bien que ce nouveau système ait été conçu pour rotavirus, il peut être appliqué chez le réovirus. En effet, l'ajout de ces trois plasmides au système de génétique inverse à quatre plasmides de réovirus permettrait de récupérer plus de mille fois plus de virus infectieux (Kanai et al., 2017).

Il est évident que l'approche par génétique inverse ouvre la porte à de multiples possibilités en ce qui concerne l'étude de réovirus. En effet, la modification de son génome est maintenant une étape grandement facilitée et cela pourrait éventuellement mener vers la création de souches au potentiel oncolytique amélioré. Ainsi, on pourrait théoriquement modifier la protéine de fixation pour que son interaction soit plus spécifique envers les cellules cancéreuses, on pourrait ajouter des gènes au virus lui permettant de produire des cytokines ou encore modifier la capacité du virus à résister à des réponses immunitaires comme l'IFN.

## 5 Contexte du projet et hypothèse

En somme, le réovirus ne cause, à priori, aucune pathologie chez l'humain. De façon intéressante, il infecte préférentiellement les cellules transformées par rapport à celles qui ne le sont pas. Des évidences laissent suggérer que la réponse IFN des cellules hôtes pourrait être en lien non seulement avec la pathogenèse virale, mais aussi avec l'activité oncolytique de réovirus. Afin d'éventuellement solidifier cette théorie, ce projet s'intéresse d'abord à l'étude de deux virus sensibles à l'IFN, le T3D<sup>K</sup> et le VeroAV.

Tout d'abord, le T3D<sup>K</sup> provient du laboratoire du Dr Dermody, pionnier dans l'utilisation des techniques de génétique inverse appliquées au réovirus de mammifères. Suite à la propagation de leur souche sauvage de sérotype 3 (T3D) à haute multiplicité d'infection, ils ont sélectionné un clone viral et en ont séquencé les dix gènes afin de cloner ces derniers sur dix plasmides différents. Il y a quelques années, ces plasmides nous ont été gracieusement envoyés et grâce à la technique de génétique inverse expliquée plus haut, nous avons pu récupérer le virus complet que nous avons appelé T3D<sup>K</sup> (car la séquence du virus a été publiée dans Kobayashi et al., 2007). De premières observations au sein de notre laboratoire avaient alors suggéré que le T3D<sup>K</sup> serait plus sensible à l'IFN que la souche sauvage de notre laboratoire T3D<sup>S</sup> (car la séquence du virus a été publiée dans Sandekian and Lemay, 2015b).

Il y a ensuite le virus mutant VeroAV, obtenu dans notre laboratoire suite à une persistance virale établie sur cellules vero. Rappelons que celles-ci ne produisent pas d'IFN de type 1 ( $\alpha$  et  $\beta$ ) en raison notamment de faibles niveaux intrinsèques d'IRF3. Durant tout le processus de persistance, l'absence d'IFN diminue la pression de sélection, ce qui explique probablement l'obtention en bout de ligne d'un virus moins résistant à l'IFN. La première étude concernant VeroAV le comparant au virus sauvage T3D<sup>S</sup> montre, en effet, que son titre viral diminue beaucoup plus drastiquement lorsque les cellules L929 infectées sont traitées avec de l'IFN  $\beta$  murin. Malgré la sensibilité accrue à l'IFN que présente VeroAV, les premiers résultats font état de niveaux d'induction d'IFN similaire au T3D<sup>S</sup> (Jabre et al., 2013).

Les virus T3D<sup>K</sup> et VeroAV diffèrent donc en séquence et en sensibilité à l'IFN par rapport à notre virus sauvage T3D<sup>S</sup>. À la lumière des connaissances et des approches scientifiques ayant été discutés dans cette revue de littérature, nous émettons l'hypothèse que,

chez le réovirus de mammifères, différents gènes viraux peuvent être impliqués dans les phénotypes variables d'induction et de sensibilité à l'IFN.

## 6 Objectifs

À ce jour, les déterminants responsables du phénotype de sensibilité à l'IFN chez les virus T3D<sup>K</sup> et VeroAV ne sont pas connus. Ce projet vise à identifier les déterminants viraux responsables de l'induction et/ou de la sensibilité à l'IFN de type 1 chez chacun d'entre eux en isolant et caractérisant des mutants viraux.

Dans un premier volet sera donc examiné le virus T3D<sup>K</sup>, un virus construit par génétique inverse dont les plasmides qui portent les gènes viraux proviennent du laboratoire de Dr Terence Dermody. Les résultats de cette étude sont présentés à la section 7.1 dans l'article publié «**Multiple proteins differing between laboratory stocks of mammalian orthoreoviruses affect both virus sensitivity to interferon and induction of interferon production during infection**» Virus Res. 2018 Mar 2;247 : 40-46.

Dans un deuxième volet sera examiné le virus VeroAV, virus mutant issu d'une persistance virale établie sur cellules vero. Les résultats de cette étude sont présentés à la section 7.2 dans l'article publié «**A single mutation in the mammalian orthoreovirus S1 gene is responsible for increased interferon sensitivity in a virus mutant selected in Vero cells**» Virology. 2019 Feb;528 : 73-79.

## 7 Résultats

### 7.1 Étude de l'induction et de la sensibilité à l'IFN chez T3D<sup>K</sup>

Dans l'article «**Multiple proteins differing between laboratory stocks of mammalian orthoreoviruses affect both virus sensitivity to interferon and induction of interferon production during infection**», nous comparons la souche T3D<sup>K</sup>, utilisée dans plusieurs laboratoires, à notre souche sauvage, le T3D<sup>S</sup>. Nous montrons que le T3D<sup>K</sup> est plus sensible aux effets de l'IFN et qu'il induit plus fortement la production d'IFN  $\beta$  et  $\alpha$  au niveau des cellules infectées. Grâce aux techniques de génétique inverse, nous montrons que les protéines  $\lambda 2$  et  $\mu 2$  du T3D<sup>K</sup> sont toutes deux nécessaires au phénotype de sensibilité alors que la combinaison de ses protéines  $\lambda 1$  et  $\mu 2$  est responsable de l'induction plus importante d'IFN. Cet article soulève l'importance de bien caractériser les différentes souches de réovirus afin d'être prudent dans leur comparaison. De façon intéressante, c'est la première fois que la protéine  $\lambda 1$  de réovirus est associée au contrôle de la réponse IFN.

#### **Contributions des auteurs:**

J'ai construit tous les réassortants viraux et j'ai effectué toutes les expériences. J'ai fait tous les graphiques et j'ai contribué à la révision du manuscrit.

### 7.1.1 Research highlights

- •Seven proteins differ between two reovirus stocks.
- •Differences in sensitivity to interferon depends on both  $\mu 2$  and  $\lambda 2$  proteins.
- •Differences in interferon induction depends on both  $\mu 2$  and  $\lambda 1$  proteins.
- •Interferon induction and sensitivity to interferon response can be partly separated.
- •Multiple reovirus proteins are involved in the control of the interferon response.



**Multiple proteins differing between laboratory stocks of mammalian orthoreoviruses affect both virus sensitivity to interferon and induction of interferon production during infection.**

**Delphine Lanoie and Guy Lemay**

*Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Université de Montréal,  
Montréal, Canada H3C 3J7*

***Running title:*** Reovirus proteins affecting interferon sensitivity and induction

## 7.1.2 Abstract

In the course of previous works, it was observed that the virus laboratory stock (T3D<sup>S</sup>) differs in sequence from the virus encoded by the ten plasmids currently in use in many laboratories (T3D<sup>K</sup>), and derived from a different original virus stock. Seven proteins are affected by these sequence differences. In the present study, replication of T3D<sup>K</sup> was shown to be more sensitive to the antiviral effect of interferon. Infection by the T3D<sup>K</sup> virus was also shown to induce the production of higher amount of  $\beta$  and  $\alpha$ -interferons compared to T3D<sup>S</sup>. Two proteins, the  $\mu$ 2 and  $\lambda$ 2 proteins, were found to be responsible for increased sensitivity to interferon while both  $\mu$ 2 and  $\lambda$ 1 are responsible for increased interferon secretion. Altogether this supports the idea that multiple reovirus proteins are involved in the control of induction of interferon and virus sensitivity to the interferon-induced response. While interrelated, interferon induction and sensitivity can be separated by defined gene combinations. While both  $\mu$ 2 and  $\lambda$ 2 were previously suspected of a role in the control of the interferon response, other proteins are also likely involved, as first shown here for  $\lambda$ 1. This also further stresses that due caution should be exerted when comparing different virus isolates with different genetic background.

**Keywords:** Reovirus; Interferon; Reverse genetics

### 7.1.3 Introduction

In the last few years, it has been observed that so-called wild-type reovirus can slightly vary in sequence from one laboratory stock to the other, even if they are all referred to as type 3 Dearing strain. This could result from random genetic drift or to different experimental conditions for virus growth. Isolation of single plaques, sometimes used as a routine procedure to avoid accumulation of non-infectious viral mutants upon virus propagation has also likely contributed to this situation. Variations between sequences of laboratory stocks are observed when comparing the few cases where complete sequences were reported from a given stock (**Kobayashi et al., 2007; van den Wollenberg et al., 2012; Chakrabarty et al., 2014; Sandekian and Lemay, 2015a**). Also, differences in phenotypic properties between virus stocks were observed in few cases (**Yin et al., 2004; Coffey et al., 2006; Nygaard et al., 2013; Berard et al., 2015**). These variations have led to the denomination of viral subtypes such as T3D<sup>C</sup>, T3D<sup>F</sup>, T3D<sup>H</sup>, T3D<sup>N</sup>, T3D<sup>K</sup>, T3D<sup>S</sup> and T3D<sup>W</sup> (**Sandekian and Lemay, 2015a**).

Previous work has shown that the viral stock encoded by the plasmids used in reverse genetics (herein referred to as T3D-Kobayashi, T3D<sup>K</sup>) do differ from the laboratory virus stock in 7 out of 11 proteins (**Sandekian and Lemay, 2015a**). In the course of this previous work the laboratory wild-type virus stock (herein referred to as T3D-Sandekian, T3D<sup>S</sup>) was reconstructed by site-directed mutagenesis and reverse genetics, in order to allow comparisons with viral mutants derived from this laboratory stock. Although this aspect was not specifically mentioned in the previous publication, it was noticed that the reverse genetics virus (T3D<sup>K</sup>) is significantly more sensitive to interferon than T3D<sup>S</sup>.

A plethora of viruses is presently considered as possible oncolytic viruses for cancer treatment as recently reviewed by many authors (**Ilkow et al., 2014; Miest and Cattaneo, 2014; Pikor et al., 2015; Turnbull et al., 2015**). Among these, reovirus is one of the most advanced in clinical settings, being currently in phase III. It presents the advantage of exhibiting a natural tropism for cancer cells while being essentially nonpathogenic in adult humans (**Kelly et al., 2009; Harrington et al., 2010; Black and Morris, 2012; Clements et al., 2014; Chakrabarty et al., 2015**). The interferon response often plays a role in determining the ability of a virus to discriminate between cancer cells, frequently exhibiting a reduced interferon response, and normal cells (**Randall and Goodbourn, 2008; Naik and Russell, 2009; Kaufman et al., 2015**).

However, examples abound where interferon can still contribute to limiting oncolytic activity, as recently reviewed (**Vaha-Koskela and Hinkkanen, 2014; Ebrahimi et al., 2017**). The original model of reovirus oncolytic activity postulated that a decreased in the interferon-induced protein kinase PKR was responsible for the increased ability of Ras-transformed cells to allow reovirus replication resulting in cell lysis (**Strong et al., 1998**). Further work indicated that the defective interferon secretion of Ras-transformed cells favors cell-to-cell viral propagation in these cells compared to normal cells (**Shmulevitz et al., 2010**). It thus appears to be essential to gain a further understanding of the viral determinants that control induction of the interferon response and the sensitivity of different viral isolates to this response. This could possibly lead to better optimization of viral strains toward oncolytic activity, as many investigators believe to be possible, and as recently reviewed (**Mohamed et al., 2015; Kemp et al., 2016**). This is especially envisaged since the advent of plasmid-based reverse genetics to manipulate the viral genome (**Lemay, 2011; van den Hengel et al., 2013; Stuart et al., 2017**). In the present study, reverse genetics was thus used to introduce each of the T3D<sup>K</sup> gene in the T3D<sup>S</sup> genetic background, either separately or in different combinations, in order to determine which protein(s) is responsible for this difference in interferon response.

While no single protein of T3D<sup>K</sup> in the T3D<sup>S</sup> background was sufficient to reconstitute the full phenotype of sensitivity observed in T3D<sup>K</sup>, a combination of  $\mu 2$  and  $\lambda 2$  was shown to be both necessary and sufficient. Also, as somewhat expected from previous studies by others (**Zurney et al., 2009; Irvin et al., 2012**), the  $\mu 2$  protein was shown to be partly responsible for higher levels of interferon induction upon T3D<sup>K</sup> infection compared to T3D<sup>S</sup>. However, an unexpected finding is that  $\lambda 1$  is also responsible for the full level of induction observed. At least three virus proteins from thus appear to be involved in the interferon response in the context of reovirus infection.

## **7.1.4 Materials and methods**

### **7.1.4.1 Cell lines and viruses**

L929 mouse fibroblasts were originally obtained from the American type culture collection (ATCC® CCL-1™). The baby hamster kidney cell line (BHK) stably expressing the

T7 RNA polymerase (BSR-T7 cells) has been described (**Buchholz et al., 1999**) and was a generous gift from the laboratory of Dr. John Hiscott (Lady Davis Research Institute, Montréal, Canada). Both cell lines were grown in minimal Eagle medium (MEM) with 5% fetal bovine serum.

Wild-type laboratory stock of reovirus type 3 (T3D<sup>S</sup>) was previously described (**Sandekian and Lemay, 2015a,b**) and was rescued by reverse genetics following introduction of the appropriate mutations in the plasmids encoding the wild-type virus from Dr. Terry Dermody's laboratory (T3D<sup>K</sup>). Other viruses, harboring various combinations of genes from T3D<sup>K</sup> in the T3D<sup>S</sup> background were obtained by reverse genetics, as described below.

All virus stocks were routinely grown on L929 cells and virus titers determined by TCID<sub>50</sub>, as described (**Danis and Lemay, 1993**). In addition, since some assays used in the course of the work rely on similar cell-killing and lysis ability of the different viruses, serial binary dilutions of each virus was used to infect L929 cells in single wells of a 96-well plates. Cells were incubated for 4–5 days before being fixed and remaining cells stained with methylene blue, as previously described (**Sandekian et al., 2013; Sandekian and Lemay, 2015a**).

#### **7.1.4.2 Reovirus reverse genetics**

The plasmids corresponding to the 10 genes of reovirus serotype 3 Dearing, T3D<sup>K</sup>, under the transcriptional control of the T7 promoter were originally obtained from the laboratory of Dr. Terence Dermody (Vanderbilt University, Nashville, Tennessee) (**Kobayashi et al., 2007**). The recovery of the wild-type laboratory stock T3D<sup>S</sup> was achieved by first submitting each plasmid to site-directed mutagenesis for each of the gene segment differing between T3D<sup>S</sup> and T3D<sup>K</sup>. Plasmids were then used to recover infectious virus by the improved reverse genetics approach using transfection in BHK cells expressing the T7 RNA polymerase (**Kobayashi et al., 2010**). Rescued viruses were propagated as described before (**Brochu-Lafontaine and Lemay, 2012; Sandekian and Lemay, 2015a,b**).

#### **7.1.4.3 Determination of interferon sensitivity**

Mouse type I  $\beta$ -interferon was obtained from PBL interferon source. Two different approaches were used to determine interferon sensitivity on mouse L929 cells. Decreased virus titer at near saturating concentration, 200 international units(IU)/ml, was measured by TCID<sub>50</sub>, as previously used. Similarly, interferon sensitivity to varying dilutions of interferon on L929 cells was determined, also as before (**Sandekian and Lemay, 2015a**). Briefly, binary dilutions of interferon were prepared from 500 IU/ml in single wells of a 96-well plates seeded with L929 cells. Cells were infected with the different viruses at a MOI of 0.05, incubated for 4–5 days before being fixed and stained with methylene blue. Remaining cell-retained stain was solubilized and quantitated, essentially as described before (**Sandekian et al., 2013**), using a Bio-TEK microplate reader Elx800. Relative cell destruction was determined by comparison with mock-infected cells.

#### **7.1.4.4 Determination of interferon induction**

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed on different dilutions of mock-infected or infected cell culture medium to determine the concentration of either  $\beta$ -interferon or all subtypes of  $\alpha$ -interferon (Verikine mouse interferon beta and alpha ELISA kit, PBL Assay Science). Results from mock-infected cells were always below detection level. Values were obtained using the microplate reader (BioTEK Elx800).

### **7.1.5 Results**

#### **7.1.5.1 Generation and characterization of T3D<sup>S</sup>/T3D<sup>K</sup> monoreassortants.**

The differences in sequence between the wild-type laboratory virus stock of reovirus serotype 3 Dearing T3D<sup>S</sup> (originally obtained from ATCC) and that of the serotype 3 Dearing recovered using the plasmid-based reverse genetics system, T3D<sup>K</sup>, were previously reported (**Sandekian and Lemay, 2015a**); for the sake of simplicity this information is repeated herein

(Table 1). A total of 24 nucleotide differences, 21 transitions and 3 transversions, were observed. These resulted in 12 amino acids changes in 7 different viral proteins.

In a first set of experiments, each of these seven T3D<sup>K</sup> genes were separately used to replace their homologous gene in the T3D<sup>S</sup> background. The seven monoreassortant viruses were recovered and propagated with similar final titers. In parallel, in order to avoid discrepancies due to possible differences in cell-killing ability at the same multiplicity of infection, cells were infected with serial binary dilutions of the different viruses, as described in Materials and methods (section 7.1.4.1). All viruses had similar replication phenotype, as measured by this approach (data not shown).

The infectious titers of the different viruses were then compared in the absence or presence of interferon at 200 IU/ml (Fig 1). Each virus exhibited resistance to interferon treatment similar to that of T3D<sup>S</sup>. Only viruses harboring the M1 gene (encoding the  $\mu$ 2 protein) and possibly the L2 gene (encoding the  $\lambda$ 2 protein) were slightly more sensitive to interferon but far from the high sensitivity observed for T3D<sup>K</sup>. The different viruses were also examined at various interferon concentrations, as described in Materials and methods (section 7.1.4.3). Again, no single gene can reconstitute the full T3D<sup>K</sup> sensitivity phenotype and only M1 had an effect in this assay (data not shown).

#### **7.1.5.2 Introduction of different T3D<sup>K</sup> gene combinations in T3D<sup>S</sup> background**

The previous results indicated that interferon sensitivity of T3D<sup>K</sup> depends on a combination of more than one gene, and suggested that at least M1 (encoding  $\mu$ 2) could be partially but not solely responsible. Results also suggested that at least one of the L genes is involved. Viruses harboring different gene combinations of T3D<sup>K</sup> in the T3D<sup>S</sup> background were thus obtained and their sensitivity to interferon first examined by the TCID<sub>50</sub> assay at 200 IU/ml of  $\beta$ -interferon (Fig. 2).

In a first virus, the M2 gene (encoding  $\mu$ 1) and the S1 gene (encoding both  $\sigma$ 1 and  $\sigma$ 1s) were left aside since they were the least likely to be involved in the previous experiment; as expected, the three L genes with M1 and M3 were sufficient to recover the full sensitivity. A

series of 4, 3 or 2 gene combinations were then examined. It appears that neither the two M genes (M1+M3) or the three L genes can reconstitute the phenotype. In contrast a combination of the three L genes with M1 (but not M3) reconstitutes the full sensitivity. When examining each of the L genes, the L2 gene together with M1 appears both necessary and sufficient while M1+L3 had an effect but did not reconstitute the full phenotype.

The two most interesting combinations, namely M1+L2 and M1+L3, were thus further examined using various dilutions of interferon (Fig. 3), as described in Materials and methods. Again, in this assay, the M1+L2 combination showed a pattern of sensitivity very close to that of T3D<sup>K</sup>, thus confirming that these two genes are sufficient to reconstitute the full sensitivity phenotype. Interestingly, the M1+L3 combination did increase interferon sensitivity to a similar level at low interferon concentration but this effect was lost at the highest interferon concentrations, approaching that of T3D<sup>S</sup>. Furthermore, when cells were infected at low MOI in the presence of high interferon concentrations (125 IU/ml), the amount of infectious virus produced by the virus harboring the M1+L2 combination and T3D<sup>K</sup> were similarly affected. In contrast, the virus harboring the M1+L3 combination behave essentially as T3D<sup>S</sup> (data not shown). Altogether, the M1+L2 combination thus appears as the main determinant of interferon sensitivity of T3D<sup>K</sup> compared to T3D<sup>S</sup>. The contribution of L3 observed more easily at lower interferon concentrations will be further discussed below.

#### **7.1.5.3 Induction of interferon by T3D<sup>K</sup> gene combinations in T3D<sup>S</sup> background**

To get a more complete understanding of the contribution of M1, L2 and L3 to the control of the interferon response, and to determine if their effect could be due to differences in induction of interferon, interferon induction following viral infection was next examined. This will also allow to verify if a direct correlation exists between induction of interferon consecutive to virus infection, and the sensitivity of the virus to interferon. Although this was not discussed in previous studies, a higher induction upon T3D<sup>K</sup> compared to T3D<sup>S</sup> infection was expected. In fact, amino acid 208 of T3D<sup>K</sup>  $\mu$ 2 protein is a serine (Table 1) previously shown to result in a decreased ability to control induction of interferon and of the interferon-induced response. In



contrast, viruses with proline at this position, as in T3D<sup>S</sup>, were more able to repress the induction (Zurney et al., 2009; Stebbing et al., 2014).

In the present study, the production of interferon at the protein level was directly measured in the culture medium of infected cells using commercially available ELISA assays. This confirmed a close to thousandfold higher  $\beta$ -interferon secretion upon T3D<sup>K</sup> infection compared to T3D<sup>S</sup> (Fig. 4). This was most evident after 15 hours post-infection, although the effect was already detected after 8 hours. These results were confirmed with  $\alpha$ -interferon, although levels were reduced compared to those of  $\beta$ -interferon.

As expected, the monoreassortant harboring solely the T3D<sup>K</sup> M1 gene in a T3D<sup>S</sup> background induced a higher amount of interferon but not as much as the T3D<sup>K</sup> virus itself. Unexpectedly, the sole presence of T3D<sup>K</sup> L3 was able to increase significantly interferon induction and a combination of M1+L3 was both necessary and sufficient to allow full induction potential as in T3D<sup>K</sup>. In contrast, the addition of L2 to M1 did not increase interferon levels compared to M1 alone.

It thus appears that, for induction of interferon, the M1+L3 combination is necessary and sufficient to reach the full level while L2 has no effect despite its role in sensitivity to exogenously added interferon. The strong combined effect of M1+L3 on interferon induction probably explains why this virus appears more sensitive to interferon. This was most evident at lower exogenous concentrations of interferon, the induced interferon contributing to the overall effect in this case.

### 7.1.6 Discussion

The importance of the interferon response in the early control of viral infection in various contexts appears to be well established. This is supported by the observations that a wide range of viruses have actually developed more than one protein, in order to control or limit this response within an acceptable limit (Hoffman et al., 2015; Lopez et al., 2015; Weber-Gerlach and Weber, 2016). Previous data have suggested that multiple reovirus proteins be involved in the control of induction of interferon or sensitivity to the interferon-induced response (Imani

**and Jacobs, 1988; Beattie et al., 1995; Bergeron et al., 1998; Sherry et al., 1998; Zurney et al., 2009; Irvin et al., 2012; Stebbing et al., 2014; Sandekian and Lemay, 2015a).** In the present study, it was further established that at least three viral proteins, namely  $\mu 2$ ,  $\lambda 2$  and  $\lambda 1$  are involved in the control of either induction and/or resistance to interferon.

In previous works from the laboratory (**Rudd and Lemay 2005; Sandekian and Lemay, 2015a; Boudreault et al. 2016**), it was shown that reovirus interferon sensitivity can be dissociated from interferon induction by a single amino acid substitution in one of the methyltransferase domains of the  $\lambda 2$  mRNA capping enzyme. In contrast, another group has shown that a single amino acid substitution in the viral  $\mu 2$  protein increases the interferon response, contributing to a concomitant increase in interferon sensitivity (**Zurney et al., 2009; Irvin et al., 2012**). In the present study, the  $\mu 2$  protein was further shown to affect the production of interferon and it was confirmed that this could affect interferon sensitivity. However, the higher interferon sensitivity of T3D<sup>K</sup> compared to T3D<sup>S</sup> is also due in part to a single amino acid difference in  $\lambda 2$ , while the higher induction of interferon also relies on a single amino acid substitution, but in  $\lambda 1$ . Altogether, these various observations further stress that, while both phenotypes are interrelated, it is still possible to partly separate induction of interferon production by reovirus infection from the sensitivity of the virus to the induced response. A role of both  $\mu 2$  and  $\lambda 2$  proteins in interferon sensitivity is also consistent with former classic genetics reassortment studies in which genes encoding both proteins were shown to be involved (**Sherry et al. 1998**).

The  $\mu 2$  protein was previously shown to affect interferon response by nuclear accumulation of interferon regulatory factor 9 (**Zurney et al., 2009**). In addition, this protein interacts with microtubules and affects the morphology of viral inclusions (**Mbisa et al., 2000; Parker et al., 2002; Miller et al., 2004; Yin et al., 2004**). More recently, it was established that this association affects virus assembly and modulates the efficiency of genome assembly, thus resulting in differences in the percentage of infectious virions produced upon infection (**Ooms et al., 2012; Shah et al., 2017**). It remains to be determined if this could also independently contribute to differences in host-cell response and virus sensitivity to interferon.

The difference in  $\lambda 2$  single amino acid difference between T3D<sup>K</sup> and T3D<sup>S</sup> is in the protein domain assigned to one of the protein's methyltransferase activity involved in mRNA

capping (**Reinisch et al. 2000; Bujnicki and Rychlewski 2001**), as was also the case in the previously isolated interferon sensitive mutant (**Sandekian and Lemay, 2015a**). The amino acid substitutions respectively at positions 504 and 636 are in fact closely located in the crystallographic structure of the viral core (PDB1EJ6). In both cases, the substitution is located at the extreme outside end of the  $\lambda 2$  turret (Fig. 5); although this position is not in direct contact with putative catalytic sites, it is tempting to speculate that it indirectly affects either cap methylation or viral mRNA exit. As mentioned by others (**Mohamed et al. 2015**), it will clearly be of interest to further examine the nature of the 5'-end of the viral mRNAs produced by these different viruses. The importance of the 2'-O-methylation of the first mRNA nucleotide has been clearly established in the last few years. For many viruses, abolished or decreased 2'-O-methylation results in increased induction of the response, increased sensitivity to this response, or both (**Daffis et al., 2011; Zust et al., 2011; Szretter et al., 2012; Habjan et al., 2013; Kimura et al., 2013; Ma et al., 2014; Menachery et al., 2014; Chang et al., 2016; Devarkar et al., 2017**). The 2'-O-methylation appears as a major discriminatory factor between cellular and foreign mRNA as a target of innate immune response (**García-Sastre, 2011; Hyde and Diamond, 2015; Leung et al., 2016**).

The involvement of the  $\lambda 1$  protein in the level of interferon induction came as a surprise finding in the course of this study. It remains to be determined if the protein can repress interferon signaling in T3D<sup>S</sup>, a property that is lost in T3D<sup>K</sup>, or if the T3D<sup>K</sup> protein positively contribute to the interferon induction. Alternatively, a defect in the T3D<sup>K</sup> protein could affect the viral mRNA synthesis or cap structure, thus indirectly contributing to augmenting interferon induction. Although the exact contribution of the two proteins to RNA synthesis and capping is not yet completely understood, purified  $\mu 2$  and  $\lambda 1$  share nucleotide and RNA triphosphatase activities (**Bisaillon and Lemay, 1997; Bisaillon et al., 1997; Kim et al., 2004**). This could suggest an impact of one or more of these activities in the production of viral mRNAs as interferon inducers. Interestingly, the single amino acid difference between T3D<sup>K</sup> and T3D<sup>S</sup> is among the 5 amino acids difference previously noted between T3D and serotype 1 T1L virus. These differences are affecting NTPase activity associated with the viral core and synthesis of the viral mRNA and/or cap structure (**Harrison et al., 1999**). Recently, viral-triggered ATP release by vesicular stomatitis virus was found to be associated with interferon induction

(Zhang et al., 2017), the relative activity of a viral ATPase is thus potentially relevant in this context and deserves further study.

Altogether, the data reported herein demonstrate that different reovirus proteins, by themselves or in combinations, could affect either induction of interferon or sensitivity of a given virus to the interferon response. It should thus be possible to combine mutant forms of different viral proteins in order to modulate both the induction of interferon and/or interferon response, and sensitivity to the response. As previously mentioned, this could well be of importance to optimize oncolytic viral strains to different tumor cell types (Randall and Goodbourn, 2008; Naik and Russell, 2009; Kaufman et al., 2015; Vaha-Koskela and Hinkkanen, 2014; Ebrahimi et al., 2017). Virus replication in the absence of exogenously added interferon was also briefly examined. As somehow expected it was noticed that the T3D<sup>K</sup> virus has an approximately three to fivefold lower viral titers than T3D<sup>S</sup> at both 24 and 48-hour post-infection in conditions allowing viral propagation (Fig. S1). Interestingly both the interferon-sensitive and interferon-inducing reassortants exhibited essentially the same replicative phenotype as T3D<sup>K</sup>. Further study will be needed to establish the importance of both phenotypes in viral replication in different cell types and *in vivo* using these viruses.

Overall, the results obtained in the present study also further stress that one should be very careful while interpreting previous data using virus stocks from different laboratories. The advent of plasmid-based reverse genetics (Kobayashi et al. 2007, 2010), and recent progress resulting in increased efficiency of the procedure (Eaton et al. 2017; Kanai et al. 2017) should now allow all laboratories to work with well genetically characterized viruses in order to avoid possible discrepancies due to unknown genetic changes in viruses used.

### 7.1.7 Acknowledgments

This work was supported by an operating (discovery) grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to G.L. Partial financial support to D.L. was obtained from the “Faculté des études supérieures” of “Université de Montréal.”

### 7.1.8 References

- Beattie, E., Denzler, K.L., Tartaglia, J., Perkus, M.E., Paoletti, E., Jacobs, B.L., 1995. Reversal of the interferon-sensitive phenotype of a vaccinia virus lacking E3L by expression of the reovirus S4 gene. *J. Virol.* 69, 499–505.
- Berard, A.R., Severini, A., Coombs, K.M., 2015. Comparative proteomic analyses of two reovirus T3D subtypes and comparison to T1L identifies multiple novel proteins in key cellular pathogenic pathways. *Proteomics* 15, 2113–2135.
- Bergeron, J., Mabrouk, T., Garzon, S., Lemay, G., 1998. Characterization of the thermosensitive ts453 reovirus mutant: increased dsRNA binding of  $\sigma 3$  protein correlates with interferon resistance. *Virology* 246, 199–210.
- Bisaillon, M., Lemay, G., 1997. Characterization of the reovirus  $\lambda 1$  protein RNA 5'-triphosphatase activity. *J. Biol. Chem.* 272, 29954–29957.
- Bisaillon, M., Bergeron, J., Lemay, G., 1997. Characterization of the nucleoside triphosphate phosphohydrolase and helicase activities of the reovirus  $\lambda 1$  protein. *J. Biol. Chem.* 272, 18298–18303.
- Black, A.J., Morris, D.G., 2012. Clinical trials involving the oncolytic virus, reovirus: Ready for prime time? *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 5, 517–520.
- Boudreault, S., Martenon-Brodeur, C., Caron, M., Garant, J.-M., Tremblay, M.-P., Armero, V.E. S., Durand, M., Lapointe, E., Thibault, P., Tremblay-Létourneau, M., Perreault, J.-P., Scott, M.S., Lemay, G., Bisaillon, M., 2016. Global profiling of the cellular alternative RNA splicing landscape during virus-host interactions. *PLoS ONE* 11, e0161914–21.
- Brochu-Lafontaine, V., Lemay, G., 2012. Addition of exogenous polypeptides on the mammalian reovirus outer capsid using reverse genetics. *J. Virol. Methods* 179, 342–350.
- Buchholz, U.J., Finke, S., Conzelmann, K.-K. 1999. Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in

- tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *J. Virol.* 73, 251–259.
- Bujnicki, J.M., Rychlewski, L., 2001. Reassignment of specificities of two cap methyltransferase domains in the reovirus  $\lambda 2$  protein. *Genome Biol.* 2, research0038.1–0038.6.
- Chakrabarty, R., Tran, H., Selvaggi, G., Hagerman, A., Thompson, B., Coffey, M., 2015. The oncolytic virus, pelareorep, as a novel anticancer agent: a review. *Invest. New Drugs* 33, 761–774.
- Chang, D.C., Hoang, L.T., Naim, A.N.M., Dong, H., Schreiber, M.J., Hibberd, M.L., Tan, M.J.A., Shi, P.-Y., 2016. Evasion of early innate immune response by 2'-O-methylation of dengue genomic RNA. *Virology* 499, 259–266.
- Clements, D., Helson, E., Gujar, S.A., Lee, P.W.K., 2014. Reovirus in cancer therapy: an evidence-based review. *Oncolytic Virother.* 3, 69–82.
- Coffey, C.M., Sheh, A., Kim, I.S., Chandran, K., Nibert, M.L., Parker, J.S.L., 2006. Reovirus outer capsid protein micro1 induces apoptosis and associates with lipid droplets, endoplasmic reticulum, and mitochondria. *J. Virol.* 80, 8422–8438.
- Daffis, S., Szretter, K.J., Schriewer, J., Li, J., Youn, S., Errett, J., Lin, T.-Y., Schneller, S., Zust, R., Dong, H., Thiel, V., Sen, G.C., Fensterl, V., Klimstra, W.B., Pierson, T.C., Buller, R.M., Gale, M., Shi, P.-Y., Diamond, M.S., 2011. 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature* 468, 452–456.
- Danis, C., Lemay, G., 1993. Protein synthesis in different cell lines infected with orthoreovirus serotype 3: inhibition of host-cell protein synthesis correlates with accelerated viral multiplication and cell killing. *Biochem. Cell Biol.* 71, 81–85.
- Devarkar, S.C., Wang, C., Miller, M.T., Ramanathan, A., Jiang, F., Khan, A.G., Patel, S.S., Marcotrigiano, J., 2016. Structural basis for m<sup>7</sup>G recognition and 2'-O-methyl discrimination in capped RNAs by the innate immune receptor RIG-I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 596–601.

- Eaton, H.E., Kobayashi, T., Dermody, T.S., Johnston, R.N., Jais, P.H., Shmulevitz, M., 2017. African swine fever virus NP868R capping enzyme promotes reovirus rescue during reverse genetics by promoting reovirus protein expression, virion assembly, and RNA incorporation into infectious virions. *J. Virol.* 91, e02416–16.
- Ebrahimi, S., Ghorbani, E., Khazaei, M., Avan, A., Ryzhikov, M., Azadmanesh, K., Hassanian, S.M., 2017. Interferon-mediated tumor resistance to oncolytic virotherapy. *J. Cell. Biochem.* 118, 1994–1999.
- García-Sastre, A., 2011. 2 methylate or not 2 methylate: viral evasion of the type I interferon response. *Nat. Immunol.* 12, 114–115.
- Habjan, M., Hubel, P., Lacerda, L., Benda, C., Holze, C., Eberl, C.H., Mann, A., Kindler, E., Gil-Cruz, C., Ziebuhr, J., Thiel, V., Pichlmair, A., 2013. Sequestration by IFIT1 impairs translation of 2'-O-unmethylated capped RNA. *PLoS Pathog.* 9, e1003663.
- Harrington, K.J., Vile, R.G., Melcher, A., Chester, J., Pandha, H.S., 2010. Clinical trials with oncolytic reovirus: Moving beyond phase I into combinations with standard therapeutics. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 91–98.
- Harrison, S.J., Farsetta, D.L., Kim, J., Noble, S., Broering, T.J., Nibert, M.L., 1999. Mammalian reovirus L3 gene sequences and evidence for a distinct amino-terminal region of the  $\lambda 1$  protein. *Virology* 258, 54–64.
- Hoffmann, H.-H., Schneider, W.M., Rice, C.M., 2015. Interferons and viruses: an evolutionary arms race of molecular interactions. *Trends Immunol* 36, 124–138.
- Hyde, J.L., Diamond, M.S., 2015. Innate immune restriction and antagonism of viral RNA lacking 2'-O methylation. *Virology* 479–480, 66–74.
- Ilkow, C.S., Swift, S.L., Bell, J.C., Diallo, J.-S., 2014. From scourge to cure: tumour-selective viral pathogenesis as a new strategy against cancer. *PLoS Pathog.* 10, e1003836.
- Imani, F., Jacobs, B.L. 1988. Inhibitory activity for the interferon-induced protein kinase is associated with the reovirus serotype 1  $\sigma 3$  protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 7887–7891.

- Irvin, S.C., Zurney, J., Ooms, L.S., Chappell, J.D., Dermody, T.S., Sherry, B., 2012. A single-amino-acid polymorphism in reovirus protein  $\mu 2$  determines repression of interferon signaling and modulates myocarditis. *J. Virol.* 86, 2302–2311.
- Kanai, Y., Komoto, S., Kawagishi, T., Nouda, R., Nagasawa, N., Onishi, M., Matsuura, Y., Taniguchi, K., Kobayashi, T., 2017. Entirely plasmid-based reverse genetics system for rotaviruses. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 114, 2349–2354.
- Kaufman, H.L., Kohlhapp, F.J., Zloza, A., 2015. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14, 642–662.
- Kelly, K., Nawrocki, S., Mita, A., Coffey, M., Giles, F.J., Mita, M., 2009. Reovirus-based therapy for cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.* 9, 817–830.
- Kemp, V., Hoeben, R., van den Wollenberg, D., 2016. Exploring reovirus plasticity for improving its use as oncolytic virus. *Viruses* 8, 4–16.
- Kim, J., Parker, J.S.L., Murray, K.E., Nibert, M.L., 2004. Nucleoside and RNA triphosphatase activities of orthoreovirus transcriptase cofactor  $\mu 2$ . *J. Biol. Chem.* 279, 4394–4403.
- Kimura, T., Katoh, H., Kayama, H., Saiga, H., Okuyama, M., Okamoto, T., Umemoto, E., Matsuura, Y., Yamamoto, M., Takeda, K., 2013. Ifit1 inhibits Japanese encephalitis virus replication through binding to 5' capped 2'-O unmethylated RNA. *J. Virol.* 87, 9997–10003.
- Kobayashi, T., Antar, A.A., Boehme, K.W., Danthi, P., Eby, E.A., Guglielmi, K.M., Holm, G.H., Johnson, E.M., Maginnis, M.S., Naik, S., Skelton, W.B., Wetzell, J.D., Wilson, G.J., Chappell, J.D., Dermody, T.S., 2007. A plasmid-based reverse genetics system for animal double-stranded RNA viruses. *Cell Host Microbe* 1, 147–157.
- Kobayashi, T., Ooms, L.S., Ikizler, M., Chappell, J.D., Dermody, T.S., 2010. An improved reverse genetics system for mammalian orthoreoviruses. *Virology* 398, 194–200.
- Lemay, G., 2011. Inverse genetics in the study of reoviruses: progress, obstacles and future developments (In French). *Virologie* 15, 53–62.
- Leung, D.W., Amarasinghe, G.K., 2016. When your cap matters: structural insights into self



- vs non-self recognition of 5' RNA by immunomodulatory host proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 36, 133–141.
- López, S., Sánchez-Tacuba, L., Moreno, J., Arias, C.F., 2015. Rotavirus strategies against the innate antiviral system. *Ann. Rev. Virol.* 3, 591–609.
- Ma, Y., Wei, Y., Zhang, X., Zhang, Y., Cai, H., Zhu, Y., Shilo, K., Oglesbee, M., Krakowka, S., Whelan, S.P.J., Li, J., Lyles, D.S., 2014. mRNA cap methylation influences pathogenesis of vesicular stomatitis virus in vivo. *J. Virol.* 88, 2913–2926.
- Mbisa, J.L., Becker, M.M., Zou, S., Dermody, T.S., Brown, E.G., 2000. Reovirus  $\mu$ 2 protein determines strain-specific differences in the rate of viral inclusion formation in L929 cells. *Virology* 272, 16–26.
- Menachery, V.D., Yount, B.L., Josset, L., Gralinski, L.E., Scobey, T., Agnihothram, S., Katze, M.G., Baric, R.S., 2014. Attenuation and restoration of severe acute respiratory syndrome coronavirus mutant lacking 2'-O-methyltransferase activity. *J. Virol.* 88, 4251–4264.
- Miest, T.S., Cattaneo, R., 2014. New viruses for cancer therapy: meeting clinical needs. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 23–34.
- Miller, C.L., Parker, J.S.L., Dinoso, J.B., Piggott, C.D.S., Perron, M.J., Nibert, M. L., 2004. Increased ubiquitination and other covariant phenotypes attributed to a strain- and temperature-dependent defect of reovirus core protein  $\mu$ 2. *J. Virol.* 78, 10291–10302.
- Mohamed, A., Johnston, R., Shmulevitz, M., 2015. Potential for improving potency and specificity of reovirus oncolysis with next-generation reovirus variants. *Viruses* 7, 6251–6278.
- Naik, S., Russell, S.J., 2009. Engineering oncolytic viruses to exploit tumor specific defects in innate immune signaling pathways. *Expert Opin. Biol. Ther.* 9, 1163–1176.
- Nygaard, R.M., Lahti, L., Boehme, K.W., Ikizler, M., Doyle, J.D., Dermody, T.S., Schiff, L.A., 2013. Genetic determinants of reovirus pathogenesis in a murine model of respiratory infection. *J. Virol.* 87, 9279–9289.

- Ooms, L.S., Jerome, W.G., Dermody, T.S., Chappell, J.D., 2012. Reovirus replication protein  $\mu 2$  influences cell tropism by promoting particle assembly within viral inclusions. *J. Virol.* 86, 10979–10987.
- Parker, J.S.L., Broering, T.J., Kim, J., Higgins, D.E., Nibert, M.L., 2002. Reovirus core protein  $\mu 2$  determines the filamentous morphology of viral inclusion bodies by interacting with and stabilizing microtubules. *J. Virol.* 76, 4483–4496.
- Pikor, L.A., Bell, J.C., Diallo, J.-S., 2015. Oncolytic viruses: exploiting cancer's deal with the devil. *Trends Cancer* 4, 266–277.
- Randall, R.E., Goodbourn, S. 2008. Interferons and viruses: an interplay between induction, signaling, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* 89, 1–47.
- Reinisch, K.M., Nibert, M.L., Harrison, S.C., 2000. Structure of the reovirus core at 3.6 Å resolution. *Nature* 404, 960–967.
- Rudd, P., Lemay, G., 2005. Correlation between interferon sensitivity of reovirus isolates and ability to discriminate between normal and Ras-transformed cells. *J. Gen. Virol.* 86, 1489–1497.
- Sandekian, V., Lemay, G., 2015a. A single amino acid substitution in the mRNA capping enzyme  $\lambda 2$  of a mammalian orthoreovirus mutant increases interferon sensitivity. *Virology*, 483, 229–235.
- Sandekian, V., Lemay, G., 2015b. Amino acids substitutions in  $\sigma 1$  and  $\mu 1$  outer capsid proteins of a Vero cell-adapted mammalian orthoreovirus are required for optimal virus binding and disassembly. *Virus Res.* 196, 20–29.
- Sandekian, V., Lim, D., Prud'homme, P., Lemay, G., 2013. Transient high level mammalian reovirus replication in a bat epithelial cell line occurs without cytopathic effect. *Virus Res.* 173, 327–335.
- Shah, P.N.M., Stanifer, M.L., Höhn, K., Engel, U., Haselmann, U., Bartenschlager, R., Kräusslich, H.-G., Krijnse-Locker, J., Boulant, S., 2017. Genome packaging of

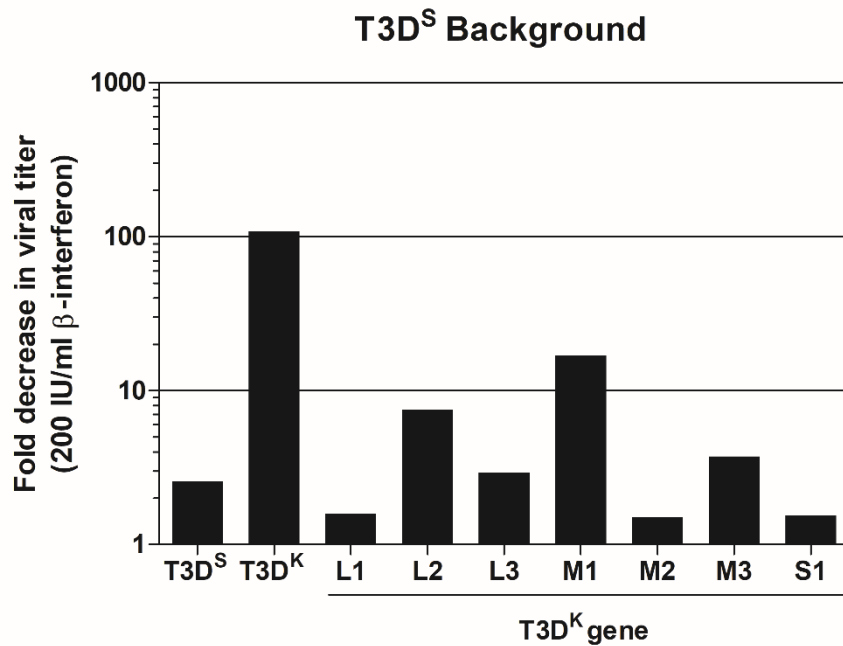
- reovirus is mediated by the scaffolding property of the microtubule network. *Cell. Microbiol.* e12765–44.
- Sherry, B., Torres, J., Blum, M.A., 1998. Reovirus induction of and sensitivity to beta interferon in cardiac myocyte cultures correlate with induction of myocarditis and are determined by viral core proteins. *J. Virol.* 72, 1314–1323.
- Shmulevitz, M., Pan, L.-Z., Garant, K., Pan, D., Lee, P.W.K., 2010. Oncogenic Ras promotes reovirus spread by suppressing IFN- $\beta$  production through negative regulation of RIG-I signaling. *Cancer Res.* 70, 4912–4921.
- Stebbing, R.E., Irvin, S.C., Rivera-Serrano, E.E., Boehme, K.W., Ikizler, M., Yoder, J.A., Dermody, T.S., Sherry, B., Lyles, D.S., 2014. An ITAM in a nonenveloped virus regulates activation of NF- $\kappa$ B, induction of beta interferon, and viral spread. *J. Virol.* 88, 2572–2583.
- Strong, J.E., Coffey, M.C., Tang, D., Sabinin, P., Lee, P.W., 1998. The molecular basis of viral oncolysis: usurpation of the Ras signaling pathway by reovirus. *EMBO J.* 17, 3351–3362.
- Stuart, J.D., Philips, M.B., Boehme, K.W., 2017. Reverse genetics for mammalian orthoreovirus, in: Perez, D.R., (Ed.), *Reverse genetics of RNA viruses: Methods and protocols*. Humana Press, pp. 1–10.
- Szretter, K.J., Daniels, B.P., Cho, H., Gainey, M.D., Yokoyama, W.M., Gale, M., Virgin, H.W., Klein, R.S., Sen, G.C., Diamond, M.S., 2012. 2'-O methylation of the viral mRNA cap by west Nile virus evades Ifit1-dependent and -independent mechanisms of host restriction in vivo. *PLoS Pathog.* 8, e1002698–13.
- Turnbull, S., West, E., Scott, K., Appleton, E., Melcher, A., Ralph, C., 2015. Evidence for oncolytic virotherapy: where have we got to and where are we going? *Viruses* 7, 6291–6312.
- Vaha-Koskela, M., Hinkkanen, A., 2014. Tumor restrictions to oncolytic virus. *Biomedicines* 2, 163–194.

- van den Hengel, S.K., Dautzenberg I.J.C., van den Wollenberg, D.J.M., Sillevius Smitt, P.A.E., Hoeben, R.C., 2013. Genetic modification in mammalian orthoreoviruses, in: Bridgen, A., (Ed.), *Reverse genetics of RNA viruses: Applications and perspectives*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, West Sussex, UK, pp. 289–317.
- van den Wollenberg, D.J.M., Dautzenberg, I.J.C., van den Hengel, S.K., Cramer, S.J., de Groot, R.J., Hoeben, R.C., 2012. Isolation of reovirus T3D mutants capable of infecting human tumor cells independent of junction adhesion molecule-A. *PLoS One* 7, e48064.
- Virgin, H.W., Mann, M.A., Fields, B.N., Tyler, K.L., 1991. Monoclonal antibodies to reovirus reveal structure/function relationships between capsid proteins and genetics of susceptibility to antibody action. *J. Virol.* 65, 6772–6781.
- Weber-Gerlach, M., Weber, F., 2016. To conquer the host, influenza virus is packing it in: interferon-antagonistic strategies beyond NS1. *J. Virol.* 90, 8389–8394.
- Yin, P., Keirstead, N.D., Broering, T.J., Arnold, M.M., Parker, J. S., Nibert, M.L., Coombs, K.M., 2004. Comparisons of the M1 genome segments and encoded  $\mu 2$  proteins of different reovirus isolates. *Virol. J.* 1, 6.
- Zhang, C., He, H., Wang, L., Zhang, N., Huang, H., Xiong, Q., Yan, Y., Wu, N., Ren, H., Han, H., Liu, M., Qian, M., Du, B., 2017. Virus-triggered ATP release limits viral replication through facilitating IFN- $\beta$  production in a P2X7-dependent manner. *J. Immunol.* 199, 1372–1381.
- Zurney, J., Kobayashi, T., Holm, G.H., Dermody, T.S., Sherry, B., 2009. Reovirus  $\mu 2$  protein inhibits interferon signaling through a novel mechanism involving nuclear accumulation of interferon regulatory factor 9. *J. Virol.* 83, 2178–2187.
- Zust, R., Cervantes-Barragan, L., Habjan, M., Maier, R., Neuman, B.W., Ziebuhr, J., Szretter, K.J., Baker, S.C., Barchet, W., Diamond, M.S., Siddell, S.G., Ludewig, B., Thiel, V., 2011. Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5. *Nat. Immunol.* 12, 137–143

**Tableau III.** (Table 1) Sequence differences between T3D<sup>S</sup> and the reverse genetics virus T3D<sup>K</sup>

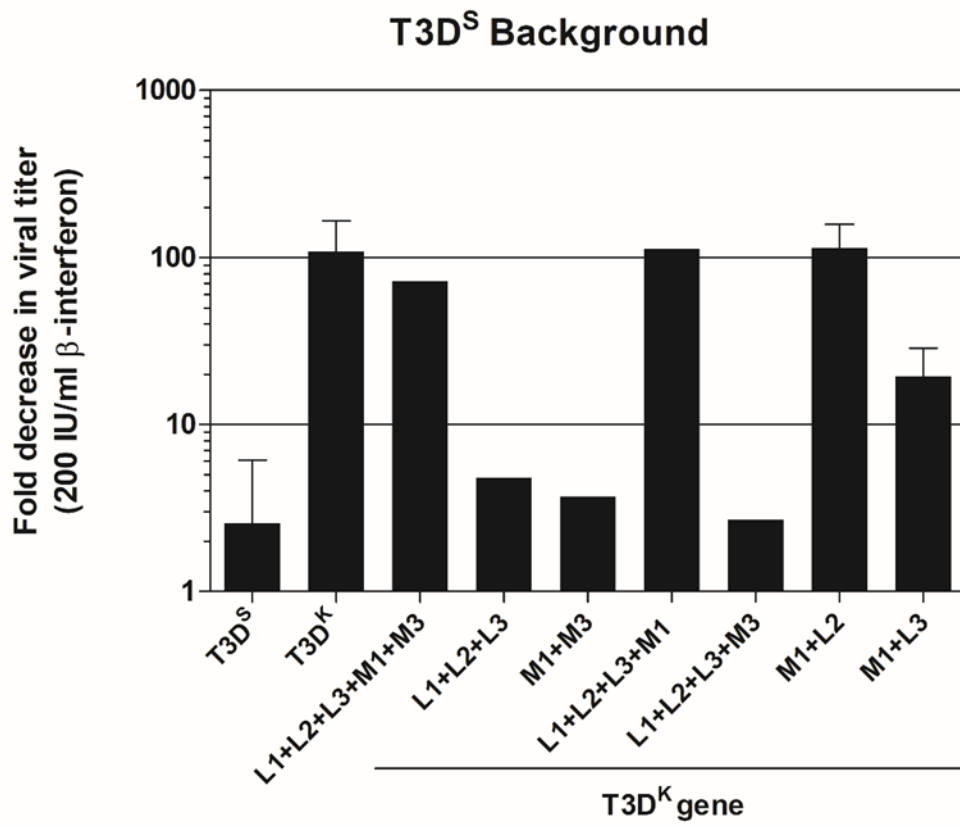
Gene (protein)	<u>Nucleotides</u>			<u>Amino acids</u>		
	T3D <sup>S</sup>	T3D <sup>K</sup>	Position	T3D <sup>S</sup>	T3D <sup>K</sup>	Position
L1 ( $\lambda$ 3)	A	G	1440	--	--	--
	G	A	2205	--	--	--
	G	A	2973	--	--	--
	G	A	3167	S	N	1048
	T	C	3594	--	--	--
L2 ( $\lambda$ 2)	A	G	1524	E	G	504
	T	C	3079	--	--	--
L3 ( $\lambda$ 1)	A	G	635	--	--	--
	G	T	1038	--	--	--
	C	T	1534	S	I	500
M1 ( $\mu$ 2)	C	T	635	P	S	208
	A	G	1038	Q	R	342
	G	A	1534	--	--	--
M2 ( $\mu$ 1)	T	C	943	V	A	305
	C	T	1173	--	--	--
	A	G	1374	T	A	449
M3 ( $\mu$ NS)	G	A	556	E	K	180
	A	C	1390	--	--	--
	T	C	2132	V	A	705
S1 ( $\sigma$ 1)	T	C	438	--	--	--
	T	C	758	I	T	249
	C	A	770	S	Y	253
	G	A	1234	A	T	408
S1 ( $\sigma$ 1s)	--	--	--	--	--	--
S2 ( $\sigma$ 2)	T	C	702	--	--	--
S3 ( $\sigma$ NS)	--	--	--	--	--	--
S4 ( $\sigma$ 3)	--	--	--	--	--	--

Accession numbers for T3D<sup>S</sup> are KP208804 to KP208813; accession number for T3D<sup>K</sup> are EF494435 to EF494444.



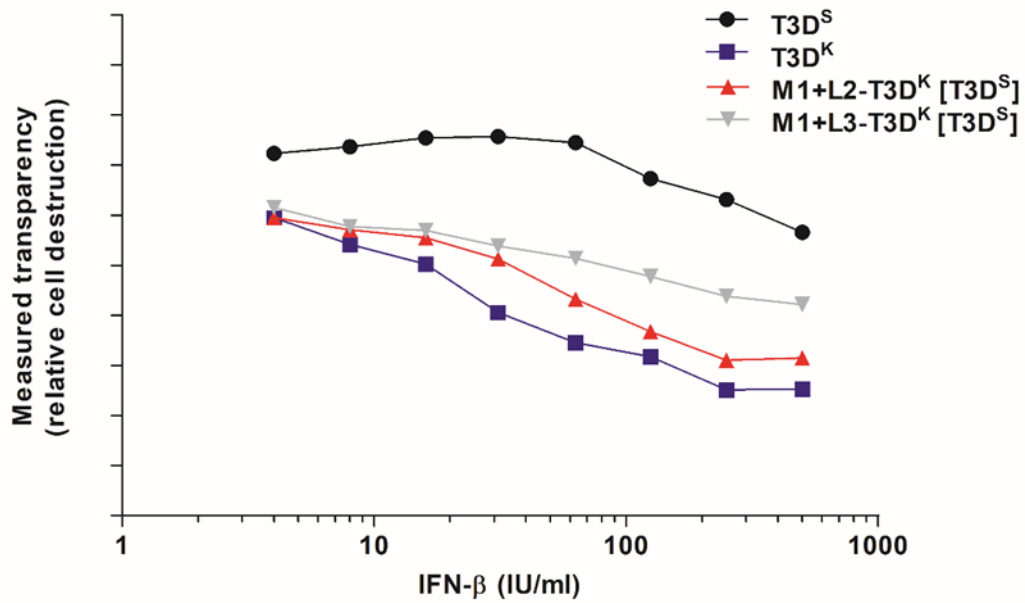
**Figure 1.** Interferon sensitivity of virus monoreassortants.

Genes from reovirus reverse genetics virus T3D<sup>K</sup> were separately introduced in the genetic background of the T3D<sup>S</sup> laboratory virus stock using reverse genetics, as described in the text. Virus titers in the absence or presence of 200 IU/ml of β-interferon were compared, as described in the text. Fold reductions in titers due to interferon presence are presented on a logarithmic scale.



**Figure 2.** Interferon sensitivity of multiple reassortants.

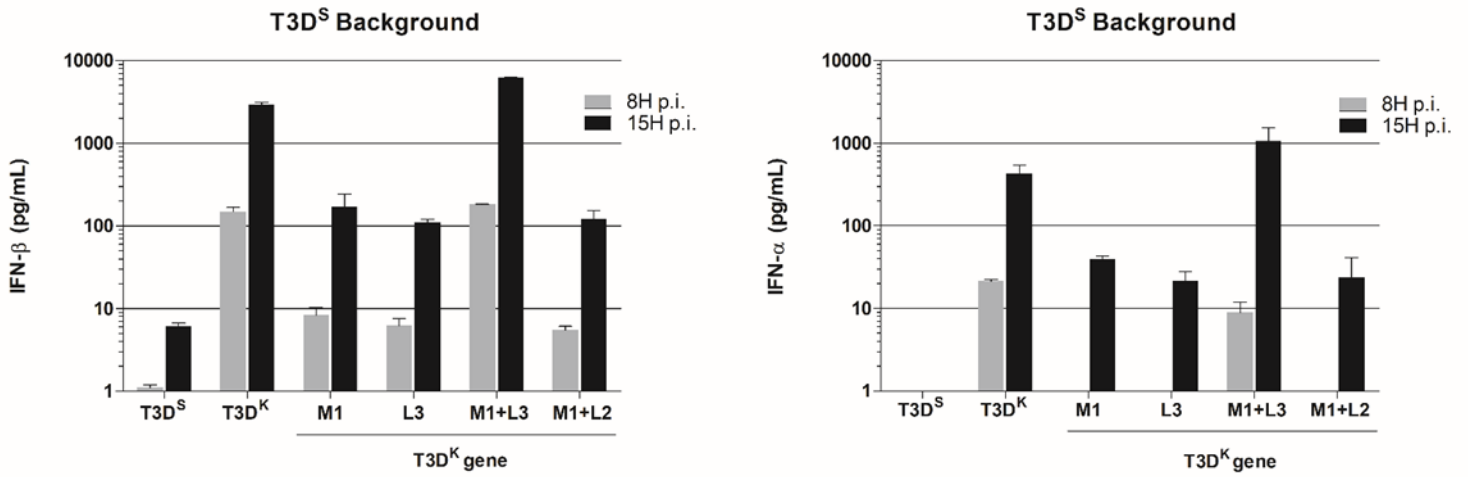
Viruses harboring various gene combinations of T3D<sup>K</sup> in the T3D<sup>S</sup> background were compared with viruses harboring the full gene complement of either parental virus. Results are presented as fold decrease in the presence of interferon, on a logarithmic scale, as in figure 1. Error bars indicate the highest value obtained in cases where two independent experiments were performed.



**Figure 3.** Sensitivity of double reassortant viruses to different interferon concentrations.

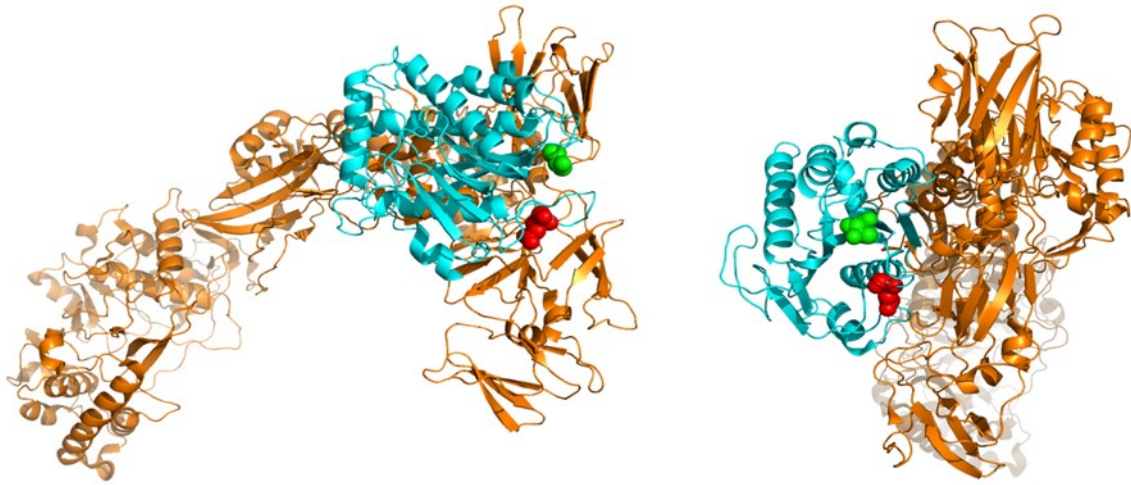
The double reassortant viruses harboring M1+L2 or M1+L3 of T3D<sup>K</sup> in the T3D<sup>S</sup> background were examined by the interferon dilution assay. The average of three independent experiments is presented as the relative cell destruction, compared to control mock-infected cells, determined by optical density of methylene blue stain, as described in Materials and methods (section 7.1.4.3).





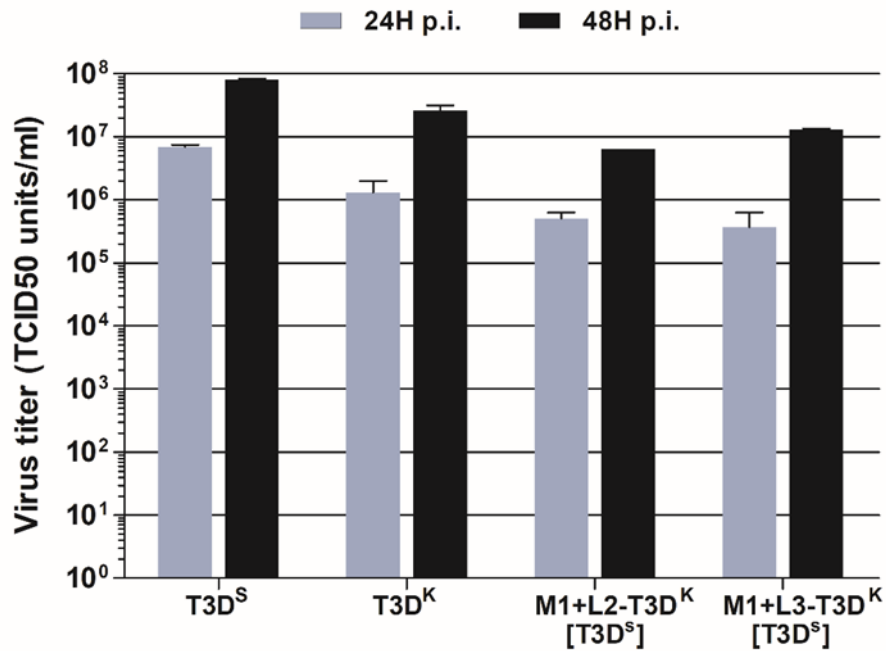
**Figure 4.** Interferon induction by viral reassortants.

L929 cells were infected at a MOI of 20 TCID<sub>50</sub> units per cell. Infected cells media were recovered after 8 or after 15 hours post-infection and directly used in commercial ELISA assay, as described in Materials and methods, for either β-interferon (left panel) or α-interferon (right panel) quantitation. Results are presented as the average of two independent experiments with error bars representing the standard error of the mean.



**Figure 5.** Positions of  $\lambda 2$  amino acid substitutions on the crystal structure (PDB1EJ6).

The position of the previously described substitution in the interferon-sensitive P4L-12 virus (amino acid 636) is indicated as a green sphere while the amino acid difference between T3D<sup>S</sup> and T3D<sup>K</sup> (amino acid 504) is indicated as a red sphere. The methyltransferase domain (amino acids 434 to 691) is in cyan. The image, at left, shows a side view of the protein, the virion-anchored region being on the left. The image at right shows a top view of the molecule from the outside of the virion. Images were obtained using the PyMOL Molecular Graphics System Version 2.0.0.



**Figure 6.** (Fig.S1.) Replicative ability of parental and reassortant viruses.

The two parental viruses T3D<sup>S</sup> and T3D<sup>K</sup>, as well as the interferon-sensitive reassortant (harboring the M1+L2 gene of T3D<sup>K</sup> in the T3D<sup>S</sup> background) and interferon-inducing reassortant (harboring the M1+L3 gene of T3D<sup>K</sup> in the T3D<sup>S</sup> background), were examined for their replicative ability. Each virus was used to infect L929 cells at a multiplication of infection of 0.05 TCID<sub>50</sub> unit per cell and cells incubated for either 24 or 48 hours. Cells and tissue culture were recovered, submitted to three cycles of freeze-thaw (−80 °C to room temperature) and infectious titers determined by TCID<sub>50</sub> on L929 cells. Results are presented as the average of two experiments with error bars representing the standard error of the mean.

## 7.2 Étude de la sensibilité à l'IFN chez VeroAV

Dans ce deuxième article, nous nous sommes maintenant penchés sur le virus mutant VeroAV, obtenu dans notre laboratoire suite à une persistance virale sur des cellules vero (Jabre, 2013). Les premières études avaient montré que VeroAV était plus sensible à l'IFN que le T3D<sup>S</sup>, mais qu'il n'induisait pas plus d'IFN que ce dernier. Le séquençage complet de VeroAV révèle la présence de substitutions d'acides aminés sur 5 protéines ( $\mu 1$ ,  $\mu 2$ ,  $\mu NS$ ,  $\sigma 1$  et  $\sigma 1s$ ). Nous avons reconstruit par génétique inverse un VeroAV afin de valider le phénotype de sensibilité observé. Par la suite, des premiers réassortants viraux permettent d'identifier le gène S1 de VeroAV comme étant important pour ce phénotype. Afin de déterminer si la sensibilité à l'IFN pouvait être attribuée à une seule des deux substitutions présentes sur le gène S1 de VeroAV (Q78P ou N198K), nous avons créés d'autres virus comportant chacun une seule des deux mutations. Nous sommes parvenus à montrer que la mutation Q78P/N59H affectant respectivement  $\sigma 1$  et  $\sigma 1s$  est principalement responsable de la sensibilité accrue de VeroAV. À noter que c'est la première fois qu'un lien est établi entre le gène S1 de réovirus et sa capacité à plus ou moins résister aux effets de l'IFN.

L'article a été accepté en décembre 2018 pour publication dans la revue *Virology* et a pour titre «**A single mutation in the mammalian orthoreovirus S1 gene is responsible for increased interferon sensitivity in a virus mutant selected in Vero cells**»

### **Contribution des auteurs:**

Le séquençage de VeroAV fut complété par Stéphanie Côté. Emmanuelle DeGeorges a réalisé des immunobuvardages de type Western qui ne sont pas présentés sous forme de figures, mais qui ont servi à alimenter la discussion de l'article. J'ai construit tous les virus réassortants et j'ai réalisé toutes les expériences présentées dans l'article. J'ai participé à la création de tous les graphiques et j'ai contribué à la révision du manuscrit.

### 7.2.1 Research highlights:

- •A Vero-cell-adapted reovirus exhibits increased sensitivity to interferon.
- •Sensitivity was assigned to a mutation in the S1 gene altering both  $\sigma 1$  and  $\sigma 1s$  proteins.
- •Abolishing  $\sigma 1s$  protein expression further increase sensitivity to interferon.
- •This reveals a new function for the small  $\sigma 1s$  protein.
- •This stresses the multigenic nature of the reovirus determinants of interferon control.

**A single mutation in the mammalian orthoreovirus S1 gene is responsible for increased interferon sensitivity in a virus mutant selected in Vero cells**

**Delphine Lanoie, Stéphanie Côté, Emmanuelle Degeorges and Guy Lemay**

*Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Université de Montréal, Montréal, Canada H3C 3J7.*

***Running title:*** Reovirus interferon sensitivity

## 7.2.2 Abstract

In a previous study, a mammalian orthoreovirus mutant was isolated based on its increased ability to infect interferon-defective Vero cells and was referred to as Vero-cells-adapted virus (VeroAV). This virus exhibits reduced ability to resist the antiviral effect of interferon. In the present study, the complete genome sequence of VeroAV was first determined. Reverse genetics was then used to identify a unique mutation on the S1 gene, overlapping the  $\sigma 1$  and  $\sigma 1s$  reading frame, resulting in increased sensitivity to interferon. A virus lacking  $\sigma 1s$  expression consecutive to mutation of its initiation codon was then shown to exhibit a further increase in sensitivity to interferon, supporting the idea that  $\sigma 1s$  is the viral protein responsible. This identification of a new determinant of reovirus sensitivity to interferon gives credentials to the idea that multiple reovirus genes are responsible for the level of interferon induction and susceptibility to the interferon-induced antiviral activities.

**Keywords:** Reovirus; Interferon; Reverse genetics

### 7.2.3 Introduction

In the last few years, it has been shown that multiple virus genes are often involved in the control of the innate immune response mediated by the interferon signaling network (Fensterl et al., 2015; Beachboard and Horner, 2016; Schulz and Mossman, 2016; Garcia-Sastre, 2017). Different viruses were also shown to exhibit many sequence changes when grown under conditions where the selective pressure to keep viral moderators of the interferon response is removed (Perez-Cidoncha et al., 2014; Hernández-Alonso et al., 2015; Garijo et al., 2016; Weber-Gerlach et al., 2016; Du et al., 2018).

The interferon response is well known to be of critical importance as a determinant of viral pathogenicity and a better understanding of viral determinants involved is thus fundamental for epidemiological surveillance as well as choosing the appropriate treatment option. It is also well accepted that the interferon response often plays a role in determining the ability of a virus to discriminate between parental and transformed/cancer cells; the latter frequently, but not always, exhibiting a reduced interferon response (Randall and Goodburn, 2008; Naik and Russell, 2009; Katsoulidis et al., 2010; Kaufman et al., 2015; Ebrahimi et al., 2017; Matveeva and Chumakov, 2018). Since a plethora of viruses are presently considered as possible oncolytic viruses for cancer treatment (Ilkow et al., 2014; Miest and Cattaneo, 2014; Pikor et al., 2015; Turnbull et al., 2015), this aspect could be of importance. A better understanding could lead to the selection of better optimized and appropriate virus strains for given cancer cell types (Pikor et al., 2015; Sanjuán and Grzelishvili, 2015).

Mammalian orthoreovirus (herein referred to as reovirus) is among the viruses presently under study for their possible use as anticancer agents; it presents the advantage of exhibiting a natural tropism for cancer cells (Black and Morris, 2012; Maitra et al., 2012; Clements et al., 2014; Chakrabarty et al., 2015). The interferon response does appear to be at least partly involved in the oncoselectivity of reovirus (Strong et al., 1998; Rudd and Lemay, 2005; Shmulevitz et al., 2010). Another advantage of reovirus as a putative agent in virotherapy is that it is believed to be essentially nonpathogenic in humans. However, this does not preclude the possible emergence of novel viral strains of increased pathogenicity, as suggested in the last few years (Kohl and Kurth, 2015; Thimmasandra Narayanappa et al., 2015; Yang et al., 2015). The importance of the interferon response in viral pathogenicity does not need to be



further stressed. This is also the case in reovirus whose pathogenicity in the heart and brain of animal models is clearly linked to its ability to control, or not, the interferon response (**Sherry et al., 1998; Goody et al., 2007; Zurney et al., 2007; Tyler et al., 2010; Dionne et al., 2011; Irvin et al., 2012; Wu et al., 2018**). Also, a recent study has raised the possibility that the virus contributes to the development of celiac disease in humans and, once again, there is a likely possibility that the interferon-mediated immune response is involved (**Bouziat et al., 2017**).

It thus appears to be essential to gain a further understanding of the viral determinants that control induction of the interferon response and the sensitivity of different viral isolates to this response. This is one of many approaches that could lead to next-generation reovirus variants that will be either more potent or more specific in their oncolytic effect (**Mohamed et al., 2015; Kemp et al., 2016**). In this context, a reovirus mutant was previously obtained by the establishment of persistence and thus long-term growth of the virus in Vero cells (**Jabre et al., 2013; Sandekian and Lemay, 2015b**). These cells are known to be deficient in production of interferon, interferon regulatory factor 3 (IRF3) and interferon-induced protein kinase PKR (**Desmyter et al., 1968; Emeny and Morgan, 1979; Park et al., 2006; Chew et al., 2009**). As somewhat expected, the resulting Vero-cell-adapted virus (VeroAV) was both adapted for better growth in Vero cells and exhibited an increased sensitivity to interferon compared to the original wild-type virus (**Jabre et al., 2013; Sandekian and Lemay, 2015b**); however, this last aspect was not examined in detail.

In the present study, the complete genome sequence of VeroAV was first determined and revealed actual amino acids substitutions in four virus genes. The plasmid-based reverse genetics (**Kobayashi et al., 2007, 2010**) was then applied to introduce each of these mutant genes in the original wild-type interferon-resistant genetic background. This allowed to confirm a strongly increased interferon sensitivity with no difference in interferon secretion and the phenotype was assigned to the S1 gene that harbors two separate mutations. The mutation responsible for increased interferon sensitivity was then shown to be located in the region of the S1 gene corresponding to the amino-proximal region of  $\sigma 1$  where its reading frame overlap with that of  $\sigma 1s$ . Introduction of a stop codon in the  $\sigma 1s$ -encoding reading frame of an otherwise wild-type virus also increases interferon sensitivity indicating that  $\sigma 1s$  is the most likely determinant involved in the virus mutant. The  $\sigma 1s$  protein thus needs to be added to the many

reovirus proteins shown to be involved in the control of either induction and/or sensitivity to the interferon response.

## 7.2.4 Results

### 7.2.4.1 Sequencing of the VeroAV genome

To determine the differences in sequence between the Vero-cell-adapted virus (**Jabre et al., 2013; Sandekian and Lemay, 2015b**) and the original serotype 3 Dearing (T3/Human/Ohio/Dearing/55) laboratory strain (T3D<sup>S</sup>), the whole coding sequence of the genome was obtained. Reverse transcription-PCR on the semi-purified viral genome from both the mutant and wild-type laboratory stocks was used to generate PCR products that were directly subjected to sequencing, as described in Materials and Methods and previously used in the laboratory. In a previous study, the sequence of S1 and M2 was solely reported (**Sandekian et al., 2015b**).

Overall, four genes were found to exhibit nonsynonymous mutations compared to the wild-type resulting in a total of 7 amino acids substitutions on 5 proteins since one of the two mutations overlaps the two reading frames in S1 (**Table 1**). Only three additional silent nucleotide substitutions were found between the wild-type and VeroAV (**data not shown**). All sequences were deposited in GenBank: the wild-type T3D<sup>S</sup> sequences were previously deposited under accession numbers KP208804 to KP208813 and sequences for VeroAV were added in the present study under accession numbers MK238541, MK238542 and MK246415 to MK246422.

### 7.2.4.2 Reverse genetics rescue and characterization of VeroAV

To confirm that the amino acid substitutions in the four VeroAV genes (S1, M1, M2 and M3) are actually responsible for the difference in interferon sensitivity between the two viruses, they were introduced in the T3D<sup>S</sup> background made of the other 6 genes. Cells were infected with the resulting virus and supernatants recovered to measure secreted  $\beta$  and  $\alpha$ -interferons, as described in Materials and methods.

The rescued VeroAV induced similarly low amount of interferon as the control rescued wild-type, T3D<sup>S</sup> (**Fig.1**). This is consistent with previous observations using a less direct approach where the ability of infected cells supernatants from the original T3D<sup>S</sup> and VeroAV were shown to exhibit a similar ability to protect against another virus (**Jabre et al., 2013**).

Interferon sensitivity was then examined first by the decrease of the virus titer in the presence of a near-saturating (200 international units [IU] per ml) concentration of type I interferon (mouse  $\beta$ -interferon without carrier protein, PBL Assay Science). As previously shown (**Sandekian and Lemay, 2015a; Lanoie and Lemay, 2018**), the rescued T3D<sup>S</sup> was quite resistant under these conditions. In contrast, the rescued VeroAV was essentially a hundredfold more sensitive (**Fig. 2**), as previously observed with the original VeroAV (**Jabre et al., 2013**). Secondly, the sensitivity to different concentrations of interferon was determined as described in Materials and methods and as used before (**Sandekian and Lemay, 2015a; Lanoie and Lemay, 2018**). Briefly, consecutive twofold dilutions of interferon were prepared from 250 IU/ml to approximately 4 IU/ml in single wells of a microplate; cell lysis in each well (4-5 days post-infection at a MOI of 0.05) was measured by transparency following methylene blue-staining compared with control well containing mock-infected cells. Again, the rescued VeroAV was significantly more sensitive than the wild-type T3D<sup>S</sup> (**Fig. 3**); using this approach, the concentration of interferon needed to decrease cell lysis from 100% (in the absence of interferon) to 50% was more than 250 IU/ml for T3D<sup>S</sup> but less than 2.5 IU/ml for VeroAV.

#### **7.2.4.3 Introduction of different VeroAV genes in the T3D<sup>S</sup> background**

Having confirmed that the four genes are actually sufficient to increase sensitivity to interferon, the three genes M1, M2 and M3 of VeroAV were then separately introduced in the wild-type T3D<sup>S</sup> background from which VeroAV was originally derived. In addition, a combination of both M2 and S1 of VeroAV was also introduced in the same background. This was necessary to examine the effect of S1 since it was previously shown that this mutant gene is poorly compatible with the wild-type M2 gene thus rendering analysis impossible due to strikingly reduced viral titer and virus replication (**Sandekian and Lemay, 2015b**).

The introduction of either the M1, M2 or M3 gene by themselves had no effect on the interferon sensitivity using either the reduction of titer assay or the interferon dilution assay

(**Fig. 2 and Fig.3 upper panel**). In contrast the introduction of S1 (with M2) resulted in a virus as sensitive as VeroAV (**Fig. 2 and Fig.3 upper panel**), indicating that the S1 gene is the only determinant of this sensitivity.

#### 7.2.4.4 Introduction of single mutations in the S1 gene

Having established that the S1 gene is responsible for the increased interferon sensitivity of VeroAV, each of the two mutations on this gene (resulting in Q78P and N198K amino acids substitutions in  $\sigma 1$ ) were solely introduced. When interferon sensitivity was assessed, the Q78P substitution was found to be both necessary and sufficient to fully reconstitute the interferon sensitivity of VeroAV (**Fig. 2 and Fig.3 lower panel**).

The involvement in interferon sensitivity of the virion binding region of the viral attachment protein appears unlikely. However, the mutation resulting in Q78P substitution on  $\sigma 1$  also overlaps the reading frame for the small nonstructural  $\sigma 1s$  in S1, the Q78P substitution in  $\sigma 1$  thus also results in a N59H substitution in  $\sigma 1s$ .

#### 7.2.4.5 Effect of $\sigma 1s$ on interferon sensitivity

The previous data indicate that the amino acid substitution in the small  $\sigma 1s$  protein is most likely responsible for increased interferon sensitivity of VeroAV, and suggest the importance of  $\sigma 1s$  in interferon control. In order to further support this idea, the initiation codon for the  $\sigma 1s$  protein was mutated from ATG to ACG on the plasmid in order to prevent its synthesis. This was done without affecting the  $\sigma 1$ -encoding sequence, thus generating a virus harboring  $\sigma 1$  from the wild-type T3D<sup>S</sup> in the absence of any  $\sigma 1s$  expression, as described by others, (**Boehme et al., 2009**). Although  $\sigma 1s$  was shown to be nonessential to viral replication per se (**Rodgers et al., 1998**), other data indicate that it plays important roles in cell-cycle arrest and apoptosis consecutive to viral infection (**Poggioli et al., 2000, 2001; Boehme et al., 2013**). Recently, an additional role in the efficient synthesis of viral proteins was also observed, at least with some viral strains and cell types (**Phillips et al., 2018**). In the present study, the T3D<sup>S</sup> virus lacking  $\sigma 1s$  (T3D<sup>S</sup>- $\sigma 1s$ -K/O) was examined for its ability to kill and lyse L929 cells at different

multiplicity of infection, as described in previous studies (**Lanoie and Lemay, 2018**). This revealed a significant decrease in the cytopathic effects of  $\sigma 1s$ -K/O virus, especially at low multiplicity of infection (data not shown). This indicates that the  $\sigma 1s$  protein does have a more important role in viral replication, and/or effect on the host cell, than initially suspected. This rendered difficult the analysis of interferon sensitivity by the interferon dilution method but the diminution of viral titer could still be used and revealed that this virus is actually a further hundredfold more sensitive to interferon than the virus mutant (**Fig. 4**). This was also observed either in the presence or absence of the M2 gene of VeroAV, confirming the sole role of the mutation corresponding to Q78P of  $\sigma 1$  (N59H in  $\sigma 1s$ ) of VeroAV S1 in interferon sensitivity of the virus mutant and the important role of  $\sigma 1s$  as an anti-interferon determinant.

### 7.2.5 Discussion

Efforts are currently underway to further understand reovirus determinants of pathogenesis and oncolytic activity and the interferon response is clearly central in these properties of various strains or isolates. Such efforts should possibly lead to the development of better adapted viruses for anticancer virotherapy applications (**Mohamed et al., 2015; Kemp et al., 2016**). In previous works, viruses were selected in the laboratory using combinations of chemical mutagenesis, high-passage virus stocks and selection of new viruses. The use of viral persistence in cells exhibiting giving properties could be an interesting approach to select new, more selective, viruses for virotherapy applications (**Kim et al., 2010**).

Using this viral persistence strategy, the Vero-cell-adapted virus (VeroAV) was previously obtained in the laboratory. This virus exhibits an adaptation at a level of increased binding to sialic acid while also showing increased sensitivity to interferon (**Jabre et al., 2013; Sandekian and Lemay, 2015b**). This is in accordance with the fact that Vero cells are defective in interferon response. Interestingly, selection of a virus mutant with increased affinity for sialic acid in murine erythroleukemia cells (tryptophan to basic arginine substitution at position 202) as in the case of VeroAV in Vero cells (asparagine to basic lysine substitution at position 198) previously led to the identification of a  $\sigma 1s$  knockout virus (**Rodgers et al., 1998**). It is tempting to speculate that the gain in infectivity due to increased sialic acid binding somehow

compensates for the loss of  $\sigma$ 1s in these viruses. Accordingly, the sole introduction of the N59H amino acid substitution and especially the introduction of a stop codon in the  $\sigma$ 1s reading frame, was observed to reduce host-cell lysis in the present study. Further work will be needed to determine the impact of  $\sigma$ 1s in different viral genetic backgrounds and different cell types.

Induction of and sensitivity to interferon are two interrelated phenomena, as previously shown for example during reovirus infection (**Sherry et al., 1998**) but they can also be viewed as somewhat independent from each other in some cases. Previous work in the laboratory has shown that a virus selected for increased sensitivity to interferon (**Rudd et al., 2005**) does not induce increased interferon secretion (**Sandekian and Lemay, 2015a**). Similarly, this virus does not exhibit apparent differences in the observed changes of cellular gene expression during infection compared to the parental wild-type virus (**Boudreault et al., 2016 and unpublished data**). More recently, comparisons were also made between T3D<sup>S</sup>, the virus laboratory stock, and T3D<sup>K</sup>, the virus recovered from the original reverse genetics plasmids (**Kobayashi et al., 2007**). Increased interferon secretion was attributed to both the  $\mu$ 2 and  $\lambda$ 1 protein while increased sensitivity is also partly dependent of  $\mu$ 2 with  $\lambda$ 2 also involved (**Lanoie and Lemay, 2018**).

In previous works, the VeroAV genome was only partly sequenced and it was established that both the  $\mu$ 1 and  $\sigma$ 1 proteins are altered (**Jabre et al., 2013; Sandekian et al., 2015b**). Since  $\mu$ 1 was altered in a way that affects viral disassembly, it was hypothesized that this could also affect its interaction with its binding partner  $\sigma$ 3 (**Jabre et al., 2013**). This protein has long been considered to be important in the control of the interferon-induced protein kinase PKR (**Jacobs and Langland, 1998; Samuel, 1998; Schiff, 2008; Sherry, 2009; Schiff**). Although, at the time, this appeared as a logical explanation to explain increased interferon sensitivity exhibited by VeroAV, it turned out not to be the case.

This involvement of  $\sigma$ 1s in the interferon sensitivity phenotype was somewhat surprising. The protein was recently shown to be involved in the efficiency of protein synthesis, although not in the same cell type and not the same virus strain (**Phillips et al., 2018**). It is also known that the protein has at least a partial nuclear localization (**Rodgers et al., 1998; Hoyt et al., 2004; Boehme et al., 2011, 2013**), suggesting that it may affect the expression of certain genes. Alternatively, the protein might interact with a factor important for the interferon

response, beyond induction of interferon per se, as shown for the  $\mu 2$ -IRF9 or  $\mu$ NS-IRF3 interactions (Zurney et al., 2009; Stanifer et al., 2017). The mutant  $\sigma 1s$  is still expressed but was found at a reduced level compared to the wild-type by immunoblotting (data not shown). Considering that the interferon sensitivity is at least a hundredfold higher when  $\sigma 1s$  is completely absent, even a small reduction in the level of the protein could well be enough to explain the phenotype; however, an additional loss of function cannot be excluded at this point. Clearly the availability of a virus mutant with an intermediate phenotype could facilitate further study of  $\sigma 1s$  impact on the interferon response and related effect on viral pathogenesis. Interestingly, approximately 50% of the 120 amino acids of  $\sigma 1s$ , including asparagine 59, are conserved in 98% or more of the 55 type 3 viral sequences recovered from the NCBI database (data not shown). In contrast, very limited sequence conservations was found between serotypes 1, 2 and 3 (data not shown). It will thus be of interest to compare the effect, if any, of  $\sigma 1s$  in other viral serotypes and to identify the common structure involved.

The  $\sigma 1s$  protein is well known for its importance in viral propagation *in vivo* (Boehme et al., 2009, 2011; Nygaard et al., 2013). It is tempting to speculate that this is due to its role in the control of the interferon response and it will be of interest to pursue these studies. The availability of viruses differing specifically in one viral determinant of interferon induction or sensitivity should certainly contribute to a better understanding of the importance of interferon in viral pathogenesis.

The  $\sigma 1s$  protein should thus be added to  $\sigma 3$ ,  $\mu 2$ ,  $\mu$ NS,  $\lambda 1$  and  $\lambda 2$ , as proteins probably involved in either the induction of or sensitivity to the interferon response (Sherry et al., 1998; Sherry 2009; Sherry et al., 2009; Zurney et al., 2009; Irvin et al., 2012; Stebbing et al., 2014; Sandekian and Lemay 2015a; Stanifer et al., 2017; Lanoie and Lemay, 2018).

It thus appears that reovirus is one further example of virus coevolution with the innate immune response leading, as previously mentioned, to a loss of the ability of the virus to resist interferon when this selective pressure is removed (Perez-Cidoncha et al., 2014; Hernández-Alonso et al., 2015; Garijo et al., 2016; Weber-Gerlach et al., 2016; Du et al., 2018). Interestingly, rotavirus, another dsRNA virus of the Reoviridae family, also uses at least three of its proteins in the control of the interferon response (Sherry 2009; Sherry et al., 2009; Arnold et al., 2013; López et al., 2015).

This also raises the possibility of combining these determinants in order to further modulate the interferon response. This could lead to further applications of the virus not only as an oncolytic agent but also as a gene or vaccine vector, as proposed previously by various authors (**Roner and Joklik, 2001; Rouault and Lemay, 2003; Kobayashi et al., 2007; Brochu-Lafontaine and Lemay, 2012; Demidenko et al., 2013; Mohamed et al., 2015; van den Wollenberg et al., 2015; Boehme et al., 2016; Kemp et al., 2016; Eaton et al., 2017; Stuart et al., 2017**).

## **7.2.6 Materials and methods**

### **7.2.6.1 Cell lines and viruses**

L929 mouse fibroblasts and Vero cells were originally obtained from the American type culture collection (ATCC®). The baby hamster kidney cell line (BHK) stably expressing the T7 RNA polymerase has been described as a generous gift from the laboratory of Dr. John Hiscott (Lady Davis Research Institute, Montréal, Canada). All cell lines were grown in minimal Eagle medium (MEM) with 5% fetal bovine serum.

Wild-type laboratory stock of reovirus type 3 (T3D<sup>S</sup>) was previously described (**Lanoie and Lemay 2018; Sandekian and Lemay 2015a,b**) and recovered by introduction of the appropriate mutations in the plasmids encoding the wild-type virus from Dr. Terry Dermody's laboratory (T3D<sup>K</sup>). The Vero-cell-adapted virus (VeroAV) was also previously described (**Jabre et al. 2013; Sandekian and Lemay 2015b**). Viruses harboring various combinations of genes from T3D<sup>S</sup> and VeroAV were obtained by reverse genetics, as described below. All virus stocks were routinely grown on L929 cells and virus titer determined by TCID<sub>50</sub>, as described (**Danis and Lemay 1993**).

### **7.2.6.2 Sequencing of the whole VeroAV genome**

Viral genomic RNA was prepared and fragments for sequencing were generated by RT-PCR, as previously described (**Brochu-Lafontaine and Lemay, 2012**), except that Vertrel was used in replacement of Freon to prepare reovirus virions (**Mendez et al., 2000**).



### 7.2.6.3 Reovirus reverse genetics

The plasmids separately harboring each of the cDNA corresponding to the 10 genes of reovirus serotype 3 Dearing, T3D<sup>K</sup>, under the transcriptional control of the T7 promoter were originally obtained from the laboratory of Dr. Terence Dermody (Vanderbilt University, Nashville, Tennessee) (Kobayashi et al. 2007). The recovery of the wild-type laboratory stock T3D<sup>S</sup> was initially achieved by first submitting each plasmid to site-directed mutagenesis for each of the gene segment differing between T3D<sup>S</sup> and T3D<sup>K</sup> (Lanoie and Lemay 2018; Sandekian and Lemay 2015a).

The 4 plasmids encoding proteins that differ between the wild-type T3D<sup>S</sup> and VeroAV were modified to reconstitute the 4 VeroAV genes; two of them (S1 and M2) were already described (Sandekian and Lemay 2015b), while the other two (M1 and M3) were obtained by site-directed mutagenesis.

The S1 gene of T3D<sup>S</sup> was further modified by site-directed mutagenesis to separately introduce each of the two amino acids substitutions in  $\sigma 1$ . In another construct, the initiation codon for the small  $\sigma 1s$  protein encoded in a second reading frame, was mutated (from ATG to ACG on the plasmid) in order to prevent the synthesis of this second protein, as described by others (Boehme et al. 2009); this construct was referred to as knockout (KO). Sequences of all primers used in mutagenesis are available upon request.

Plasmids were then used to recover infectious virus by the reverse genetics approach using transfection in BHK cells expressing the T7 RNA polymerase (Kobayashi et al. 2010) and rescued viruses were propagated as described before (Brochu-Lafontaine and Lemay 2012; Sandekian et al. 2015a,b).

### 7.2.6.4 Determination of interferon induction

ELISA assay was performed on different dilutions of the tissue culture medium to determine the concentration of both  $\beta$ -interferon and all subtypes of  $\alpha$ -interferon (Verikine mouse interferon beta and alpha ELISA kit, PBL Assay Science).

### 7.2.6.5 Determination of interferon sensitivity

Mouse type I  $\beta$ -interferon was obtained from PBL interferon source. Interferon sensitivity was determined on mouse L929 cells using different approaches. In a first approach, decreased virus titer at near-saturating (200 IU/ml) concentration on L929 cells was measured by TCID<sub>50</sub>, as previously used (Sandekian and Lemay 2015a; Lanoie and Lemay 2018). Secondly, twofold dilutions of interferon were prepared from 250 IU/ml to approximately 4 IU/ml in single wells of a 96 wells microplates seeded with L929 cells; cells were then infected with the different viruses at a MOI of 0.05, incubated for 4–5 days before being fixed and stained with methylene blue, essentially as described (Sandekian and Lemay 2015a; Lanoie and Lemay 2018).

### 7.2.7 Acknowledgments

We thank Véronique Sandekian for her initial participation in sequencing of VeroAV. This work was supported by operating (discovery) grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to G.L. S.C. was supported in part by an Undergraduate Student Research Award from NSERC. We also thank the “Faculté des études supérieures” of “Université de Montréal” for partial financial support to D.L.

### 7.2.8 References

- Arnold, M.M., Sen, A., Greenberg, H.B., Patton, J.T., 2013. The battle between rotavirus and its host for control of the interferon signaling pathway. *PLoS Pathog.* 9, e1003064. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003064>.
- Beachboard, D.C., Horner, S.M., 2016. Innate immune evasion strategies of DNA and RNA viruses. *Curr. Opin. Microbiol.* 32, 113–119. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2016.05.015>.
- Black, A.J., Morris, D.G., 2012. Clinical trials involving the oncolytic virus, reovirus: Ready for prime time? *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 5, 517–520. <http://dx.doi.org/10.1586/ecp.12.53>.

- Boehme, K.W., Guglielmi, K.M., Dermody, T.S., 2009. Reovirus nonstructural protein  $\sigma 1s$  is required for establishment of viremia and systemic dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 19986–19991. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0907412106>.
- Boehme, K.W., Frierson, J.M., Konopka, J.L., Kobayashi, T., Dermody, T.S., 2011. The reovirus  $\sigma 1s$  protein is a determinant of hematogenous but not neural viral dissemination in mice. *J. Virol.* 85, 11781–11790. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02289-10>.
- Boehme, K.W., Hammer, K., Tollefson, W.C., Konopka-Anstadt, J.L., Kobayashi, T., Dermody, T.S., 2013. Nonstructural protein  $\sigma 1s$  mediates reovirus-induced cell cycle arrest and apoptosis. *J. Virol.* 87, 12967–12979. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02080-13>.
- Boehme, K.W., Ikizler, M., Iskarpatyoti, J.A., Wetzel, J.D., Willis, J., Crowe, J.E., Jr, Labranche, C.C., Montefiori, D.C., Wilson, G.J., Dermody, T.S., 2016. Engineering recombinant reoviruses to display gp41 membrane-proximal external-region epitopes from HIV-1. *mSphere* 1, e00086—16–15. <http://dx.doi.org/10.1128/mSphere.00086-16>.
- Boudreault, S., Martenon-Brodeur, C., Caron, M., Garant, J.-M., Tremblay, M.-P., Armero, V.E. S., Durand, M., Lapointe, E., Thibault, P., Tremblay-Létourneau, M., Perreault, J.-P., Scott, M.S., Lemay, G., Bisaillon, M., 2016. Global profiling of the cellular alternative RNA splicing landscape during virus-host interactions. *PLoS ONE* 11, e0161914–21. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0161914>.
- Bouziat, R., Hinterleitner, R., Brown, J. J., Stencel-Baerenwald, J. E., Ikizler, M., Mayassi, T., Marlies, M., Kim, S.M., Discepolo, V., Pruijssers, A.J., Ernest, J.D., Iskarpatyoti, J.A., Costes, L.M.M., Lawrence, I., Palanski, B.A., Varma, M., Zurenski, M.A., Khomandiak, S., McAllister, N., Aravamudhan, P., Boehme, K.W., Hu, F., Samsom, J.N., Reinecker, H.-C., Kupfer, S.S., Guandalini, S., Semrad, C.E., Abadie, V., Khosla, C., Barreiro, L.B., Xavier, R.J., Ng, A., Dermody, T.S., Jabri, B. 2017. Reovirus infection triggers inflammatory responses to dietary antigens and development of celiac disease. *Science* 356, 44–50. <http://dx.doi.org/10.1126/science.aah5298>.

- Brochu-Lafontaine, V., Lemay, G., 2012. Addition of exogenous polypeptides on the mammalian reovirus outer capsid using reverse genetics. *J. Virol. Methods* 179, 342–350. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2011>.
- Chakrabarty, R., Tran, H., Selvaggi, G., Hagerman, A., Thompson, B., Coffey, M., 2015. The oncolytic virus, pelareorep, as a novel anticancer agent: a review. *Invest. New Drugs* 33, 761–774. <http://dx.doi.org/10.1007/s10637-015-0216-8>.
- Chew, T., Noyce, R., Collins, S.E., Hancock, M.H., Mossman, K.L. 2009. Characterization of the interferon regulatory factor 3-mediated antiviral response in a cell line deficient for IFN production. *Mol. Immunol.* 46, 393–399. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2008.10.010>.
- Clements, D., Helson, E., Gujar, S.A., Lee, P.W.K., 2014. Reovirus in cancer therapy: an evidence-based review. *Oncolytic Virother.* 3, 69–82. <http://dx.doi.org/10.2147/OV.S51321>.
- Danis, C., Lemay, G., 1993. Protein synthesis in different cell lines infected with orthoreovirus serotype 3: inhibition of host-cell protein synthesis correlates with accelerated viral multiplication and cell killing. *Biochem. Cell Biol.* 71, 81–85. <http://dx.doi.org/10.1139/o93-012>.
- Demidenko, A.A., Blattman, J.N., Blattman, N.N., Greenberg, P.D., Nibert, M.L., 2013. Engineering recombinant reoviruses with tandem repeats and a tetravirus 2A-like element for exogenous polypeptide expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, E1867–76. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1220107110>.
- Desmyter, J., Melnick, J.L., Rawls, W.E. 1968. Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero). *J. Virol.* 2, 955–961.
- Dionne, K.R., Galvin, J.M., Schittone, S.A., Clarke, P., Tyler, K.L., 2011. Type I interferon signaling limits reoviral tropism within the brain and prevents lethal systemic infection. *J. Neurovirol.* 17, 314–326. <http://dx.doi.org/10.1007/s13365-011-0038-1>.
- Du, Y., Xin, L., Shi, Y., Zhang, T.-H., Wu, N.C., Dai, L., Gong, D., Brar, G., Shu, S., Luo, J., Reiley, W., Tseng, Y.-W., Bai, H., Wu, T.-T., Wang, J., Shu, Y., Sun, R., 2018. Genome-wide identification of interferon-sensitive mutations enables influenza vaccine design. *Science* 359, 290–296. <http://dx.doi.org/10.1126/science.aan8806>.

- Eaton, H.E., Kobayashi, T., Dermody, T.S., Johnston, R.N., Jais, P.H., Shmulevitz, M., 2017. African swine fever virus NP868R capping enzyme promotes reovirus rescue during reverse genetics by promoting reovirus protein expression, virion assembly, and RNA incorporation into infectious virions. *J. Virol.* 91, e02416–16–54. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02416-16>.
- Ebrahimi, S., Ghorbani, E., Khazaei, M., Avan, A., Ryzhikov, M., Azadmanesh, K., Hassanian, S.M., 2017. Interferon-mediated tumor resistance to oncolytic virotherapy. *J. Cell. Biochem.* 118, 1994–1999. <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.25917>.
- Emeny, J.M., Morgan, M.J. 1979. Regulation of the interferon system - evidence that Vero cells have a genetic defect in interferon production. *J. Gen. Virol.* 43, 247–252. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-43-1-247>.
- Fensterl, V., Chattopadhyay, S., Sen, G.C., 2015. No love lost between viruses and interferons. *Annu. Rev. Virol.* 2, 549–572. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-virology-100114-055249>.
- García-Sastre, A., 2017. Ten strategies of interferon evasion by viruses. *Cell Host Microbe* 22, 176–184. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2017.07.012>.
- Garijo, R., Cuevas, J.M., Briz, Á., Sanjuán, R., 2016. Constrained evolvability of interferon suppression in an RNA virus. *Sci. Rep.*, 1–10. <http://dx.doi.org/10.1038/srep24722>.
- Goody, R.J., Beckham, J.D., Rubtsova, K., Tyler, K.L., 2007. JAK-STAT signaling pathways are activated in the brain following reovirus infection. *J. Neurovirol.* 13, 373–383. <http://dx.doi.org/10.1080/13550280701344983>.
- Hernández-Alonso, P., Garijo, R., Cuevas, J.M., Sanjuán, R., 2015. Experimental evolution of an RNA virus in cells with innate immunity defects. *Virus Evol.* 1, vev008–7. <http://dx.doi.org/10.1093/ve/ve008>.
- Hoyt, C.C., Bouchard, R.J., Tyler, K.L., 2004. Novel nuclear herniations induced by nuclear localization of a viral protein. *J. Virol.* 78, 6360–6369. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.78.12.6360-6369.2004>.
- Ilkow, C.S., Swift, S.L., Bell, J.C., Diallo, J.-S., 2014. From scourge to cure: tumour-selective viral pathogenesis as a new strategy against cancer. *PLoS Pathog.* 10, e1003836. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003836>.

- Irvin, S.C., Zurney, J., Ooms, L.S., Chappell, J.D., Dermody, T.S., Sherry, B., 2012. A single-amino-acid polymorphism in reovirus protein  $\mu 2$  determines repression of interferon signaling and modulates myocarditis. *J. Virol.* 86, 2302–2311. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.06236-11>.
- Jabre, R., Sandekian, V., Lemay, G., 2013. Amino acid substitutions in  $\sigma 1$  and  $\mu 1$  outer capsid proteins are selected during mammalian reovirus adaptation to Vero cells. *Virus Res.* 176, 188–198. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2013.06.007>.
- Jacobs, B.L., Langland, J.O., 1998. Reovirus  $\sigma 3$  protein: dsRNA binding and inhibition of RNA-activated protein kinase. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 233, 185–196.
- Katsoulidis, E., Kaur, S., Plataniias, L.C., 2010. Deregulation of interferon signaling in malignant cells. *Pharmaceuticals*, 3, 406–418. <http://dx.doi.org/10.3390/ph3020406>.
- Kaufman, H.L., Kohlhapp, F.J., Zloza, A., 2015. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14, 642–662. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd4663>.
- Kemp, V., Hoeben, R., van den Wollenberg, D., 2016. Exploring reovirus plasticity for improving its use as oncolytic virus. *Viruses* 8, 4–16. <http://dx.doi.org/10.3390/v8010004>.
- Kim, M., Egan, C., Alain, T., Urbanski, S.J., Lee, P.W., Forsyth, P.A., Johnston, R.N., 2007. Acquired resistance to reoviral oncolysis in Ras-transformed fibrosarcoma cells. *Oncogene* 26, 4124–4134. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1210189>.
- Kobayashi, T., Antar, A.A., Boehme, K.W., Danthi, P., Eby, E.A., Guglielmi, K.M., Holm, G.H., Johnson, E.M., Maginnis, M.S., Naik, S., Skelton, W.B., Wetzel, J.D., Wilson, G.J., Chappell, J.D., Dermody, T.S., 2007. A plasmid-based reverse genetics system for animal double-stranded RNA viruses. *Cell Host Microbe* 1, 147–157. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2007.03.003>.
- Kobayashi, T., Ooms, L.S., Ikizler, M., Chappell, J.D., Dermody, T.S., 2010. An improved reverse genetics system for mammalian orthoreoviruses. *Virology* 398, 194–200. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2009.11.037>.
- Kohl, C., Kurth, A. 2015. Bat Reoviruses. In: Wang, L.-F., Cowled, C. (Eds.), *Bats and viruses: a new frontier of emerging infectious diseases*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, pp. 203–215.

- Lanoie, D., Lemay, G. 2018. Multiple proteins differing between laboratory stocks of mammalian orthoreoviruses affect both virus sensitivity to interferon and induction of interferon production during infection. *Virus Res.* 247, 40–46. <http://dx.10.1016/j.virusres.2018.01.009>.
- López, S., Sánchez-Tacuba, L., Moreno, J., Arias, C.F., 2015. Rotavirus strategies against the innate antiviral system. *Ann. Rev. Virol.* 3, 591–609. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042152>.
- Maitra, R., Ghalib, M.H., Goel, S., 2012. Reovirus: a targeted therapeutic – progress and potential. *Mol. Cancer Res.* 10, 1514–1525. <http://dx.doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-12-0157>.
- Matveeva, O.V., Chumakov, P.M., 2018. Defects in interferon pathways as potential biomarkers of sensitivity to oncolytic viruses. *Rev. Med. Virol.* 203, e2008–13. <http://dx.doi.org/10.1002/rmv.2008>.
- Mendez, I.I., Hermann, L.L., Hazelton, P.R., Coombs, K.M., 2000. A comparative analysis of freon substitutes in the purification of reovirus and calicivirus. *J. Virol. Methods* 90, 59–67. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934\(00\)00217-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934(00)00217-2).
- Miest, T.S., Cattaneo, R., 2014. New viruses for cancer therapy: meeting clinical needs. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 23–34. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3140>.
- Mohamed, A., Johnston, R., Shmulevitz, M., 2015. Potential for improving potency and specificity of reovirus oncolysis with next-generation reovirus variants. *Viruses* 7, 6251–6278. <http://dx.doi.org/10.3390/v7122936>.
- Naik, S., Russell, S.J., 2009. Engineering oncolytic viruses to exploit tumor specific defects in innate immune signaling pathways. *Expert Opin. Biol. Ther.* 9, 1163–1176. <http://dx.doi.org/10.1517/147125900903170653>.
- Nygaard, R.M., Lahti, L., Boehme, K.W., Ikizler, M., Doyle, J.D., Dermody, T.S., Schiff, L.A., 2013. Genetic determinants of reovirus pathogenesis in a murine model of respiratory infection. *J. Virol.* 87, 9279–9289. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00182-13>.
- Park, S., Choi, J., Kang, J., Choi, S., Hwang, S., Kim, J., Ahn, B., 2006. Attenuated expression of interferon-induced protein kinase PKR in a simian cell devoid of type I interferons. *Mol. Cells* 21, 21–28.

- Perez-Cidoncha, M., Killip, M.J., Oliveros, J.C., Asensio, V.J., Fernandez, Y., Bengoechea, J.A., Randall, R.E., Ortín, J., 2014. An unbiased genetic screen reveals the polygenic nature of the influenza virus anti-interferon response. *J. Virol.* 88, 4632–4646. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00014-14>.
- Phillips, M.B., Stuart, J.D., Simon, E.J., Boehme, K.W., 2018. Non-structural protein  $\sigma 1s$  is required for optimal reovirus protein expression. *J. Virol.* 92, e02259–17. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02259-17>.
- Pikor, L.A., Bell, J.C., Diallo, J.-S., 2015. Oncolytic viruses: exploiting cancer's deal with the devil. *Trends Cancer* 1, 266–277. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trecan.2015.10.004>.
- Poggioli, G.J., Keefer, C., Connolly, J.L., Dermody, T.S., Tyler, K.L., 2000. Reovirus-induced G(2)/M cell cycle arrest requires  $\sigma 1s$  and occurs in the absence of apoptosis. *J. Virol.* 74, 9562–9570.
- Poggioli, G.J., Dermody, T.S., Tyler, K.L., 2001. Reovirus-induced  $\sigma 1s$ -dependent G2/M phase cell cycle arrest is associated with inhibition of p34cdc2. *J. Virol.* 75, 7429–7434. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.75.16.7429-7434.2001>.
- Randall, R.E., Goodbourn, S. 2008. Interferons and viruses: an interplay between induction, signaling, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* 89, 1–47. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.83891-0>.
- Rodgers, S.E., Connolly, J.L., Chappell, J.D., Dermody, T.S., 1998. Reovirus growth in cell culture does not require the full complement of viral proteins: identification of a  $\sigma 1s$ -null mutant. *Journal of Virology*, 72, 8597–8604. <http://dx.doi.org/10.1089/jir.2009.0072>.
- Roner, M.R., Joklik, W.K., 2001. Reovirus reverse genetics: Incorporation of the CAT gene into the reovirus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 8036–8041. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.131203198>.
- Rouault, É., Lemay, G., 2003. Incorporation of epitope-tagged viral  $\sigma 3$  proteins to reovirus virions. *Can. J. Microbiol.* 49, 407–417. <http://dx.doi.org/10.1139/w03-043>.
- Rudd, P., Lemay, G., 2005. Correlation between interferon sensitivity of reovirus isolates and ability to discriminate between normal and Ras-transformed cells. *J. Gen. Virol.* 86, 1489–1497. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.80628-0>.



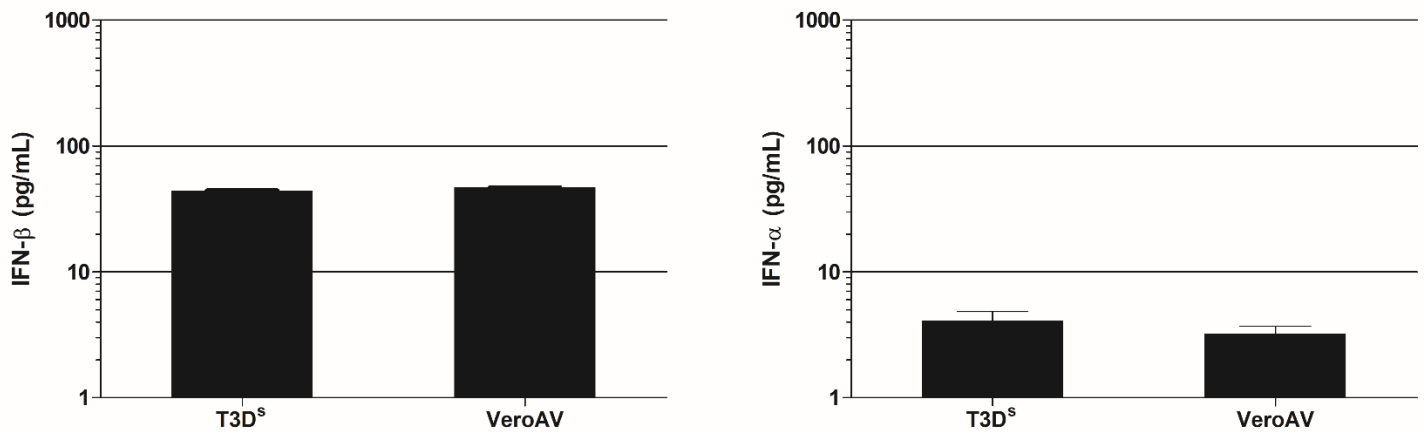
- Samuel, C.E., 1998. Reoviruses and the interferon system. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 233, 125–145.
- Sandekian, V., Lim, D., Prud'homme, P., Lemay, G., 2013. Transient high level mammalian reovirus replication in a bat epithelial cell line occurs without cytopathic effect. *Virus Res.* 173, 327–335. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2013.01.010>.
- Sandekian, V., Lemay, G., 2015a. A single amino acid substitution in the mRNA capping enzyme  $\lambda 2$  of a mammalian orthoreovirus mutant increases interferon sensitivity. *Virology*, 483, 229–235. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2015.05.020>.
- Sandekian, V., Lemay, G., 2015b. Amino acids substitutions in  $\sigma 1$  and  $\mu 1$  outer capsid proteins of a Vero cell-adapted mammalian orthoreovirus are required for optimal virus binding and disassembly. *Virus Res.* 196, 20–29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2014>.
- Sanjuán, R., Grdzelišvili, V.Z., 2015. Evolution of oncolytic viruses. *Curr. Opin. Virol.* 13, 1–5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2015.01.014>.
- Schiff, L.A., 2008. Structure and functions of the orthoreovirus  $\sigma 3$  protein. In: Patton, J.T. (Ed.), *Segmented Double-Stranded RNA Viruses: Structure and Molecular Biology*. Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp. 173–188.
- Schulz, K.S., Mossman, K.L., 2016. Viral evasion strategies in type I IFN signaling – A summary of recent developments. *Front. Immunol.* 7 459–10. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2016.00498>.
- Sherry, B., Torres, J., Blum, M.A., 1998. Reovirus induction of and sensitivity to beta interferon in cardiac myocyte cultures correlate with induction of myocarditis and are determined by viral core proteins. *J. Virol.* 72, 1314–1323.
- Sherry, B., 2009. Rotavirus and reovirus modulation of the interferon response. *J. Interferon Cytokine Res.* 29, 559–567. <http://dx.doi.org/10.1089/jir.2009.0072>.
- Sherry, B., Patton, J.T., Dermody, T.S., 2009. Innate immune responses elicited by reovirus and rotavirus. In: Brasier, A.R., Garcia-Sastre, A., Lemon, S.M., (Eds.), *Cellular signaling and innate immune responses to RNA virus infections*. ASM Press, Washington, D.C. pp. 403–422.
- Shmulevitz, M., Pan, L.-Z., Garant, K., Pan, D., Lee, P.W.K., 2010. Oncogenic Ras promotes reovirus spread by suppressing IFN- $\beta$  production through negative regulation of RIG-

- I signaling. *Cancer Res.* 70, 4912–4921. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4676>.
- Stanifer, M.L., Kischnick, C., Rippert, A., Albrecht, D., Boulant, S., 2017. Reovirus inhibits interferon production by sequestering IRF3 into viral factories. *Sci. Rep.* 7, 10873. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-11469-6>.
- Stebbing, R.E., Irvin, S.C., Rivera-Serrano, E.E., Boehme, K.W., Ikizler, M., Yoder, J.A., Dermody, T.S., Sherry, B., Lyles, D.S., 2014. An ITAM in a nonenveloped virus regulates activation of NF- $\kappa$ B, induction of beta interferon, and viral spread. *J. Virol.* 88,2572–2583. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02573-13>.
- Strong, J.E., Coffey, M.C., Tang, D., Sabinin, P., Lee, P.W., 1998. The molecular basis of viral oncolysis: usurpation of the Ras signaling pathway by reovirus. *EMBO J.* 17, 3351–3362. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/17.12.3351>.
- Stuart, J.D., Phillips, M.B., Boehme, K.W., 2017. Reverse genetics for mammalian orthoreovirus. *Methods Mol. Biol.* 1602, 1–10. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-6964-7\\_1](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-6964-7_1).
- Thimmasandra Narayanappa, A., Sooryanarain, H., Deventhiran, J., Cao, D., Ammayappan Venkatachalam, B., Kambiranda, D., LeRoith, T., Heffron, C.L., Lindstrom, N., Hall, K., Jobst, P., Sexton, C., Meng, X.J., Elankumaran, S. 2015. A novel pathogenic mammalian orthoreovirus from diarrheic pigs and swine blood meal in the United States. *mBio* 6, e00593—15–11. <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00593-15>.
- Turnbull, S., West, E., Scott, K., Appleton, E., Melcher, A., Ralph, C., 2015. Evidence for oncolytic virotherapy: where have we got to and where are we going? *Viruses* 7, 6291–6312. <http://dx.doi.org/10.3390/v7122938>.
- Tyler, K.L., Leser, J.S., Phang, T.L., Clarke, P., 2010. Gene expression in the brain during reovirus encephalitis. *J. Neurovirol.* 16, 56–71. <http://dx.doi.org/10.3109/13550280903586394>.
- van den Wollenberg, D.J.M., Dautzenberg, I.J.C., Ros, W., Lipińska, A.D., van den Hengel, S.K., Hoeben, R.C., 2015. Replicating reoviruses with a transgene replacing the codons for the head domain of the viral spike. *Gene Ther.* 22, 267–279. <http://dx.doi.org/10.1038/gt.2014.126>.

- Weber-Gerlach, M., Weber, F., 2016. To conquer the host, Influenza virus is packing it in: interferon-antagonistic strategies beyond NS1. *J. Virol.* 90, 8389–8394. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00041-16>.
- Wu, A.G., Pruijssers, A.J., Brown, J.J., Stencel-Baerenwald, J.E., Sutherland, D.M., Iskarpatyoti, J.A., Dermody, T.S., 2018. Age-dependent susceptibility to reovirus encephalitis in mice is influenced by maturation of the type-I interferon response. *Pediatr. Res.* 83, 1057–1066. <http://dx.doi.org/10.1038/pr.2018.13>.
- Yang, X.-L., Tan, B., Wang, B., Li, W., Wang, N., Luo, C.-M., Wang, M.-N., Zhang, W., Li, B., Peng, C., Ge, X.-Y., Zhang, L.-B., Shi, Z.-L. 2015. Isolation and identification of bat viruses closely related to human, porcine and mink orthoreoviruses. *J. Gen. Virol.* 96, 3525–3531. <http://dx.doi.org/10.1099/jgv.0.000314>.
- Zurney, J., Howard, K.E., Sherry, B., 2007. Basal expression levels of IFNAR and Jak-STAT components are determinants of cell-type-specific differences in cardiac antiviral responses. *J. Virol.* 81, 13668–13680. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01172-07>.
- Zurney, J., Kobayashi, T., Holm, G.H., Dermody, T.S., Sherry, B., 2009. Reovirus  $\mu$ 2 protein inhibits interferon signaling through a novel mechanism involving nuclear accumulation of interferon regulatory factor 9. *J. Virol.* 83, 2178–2187. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01787-08>

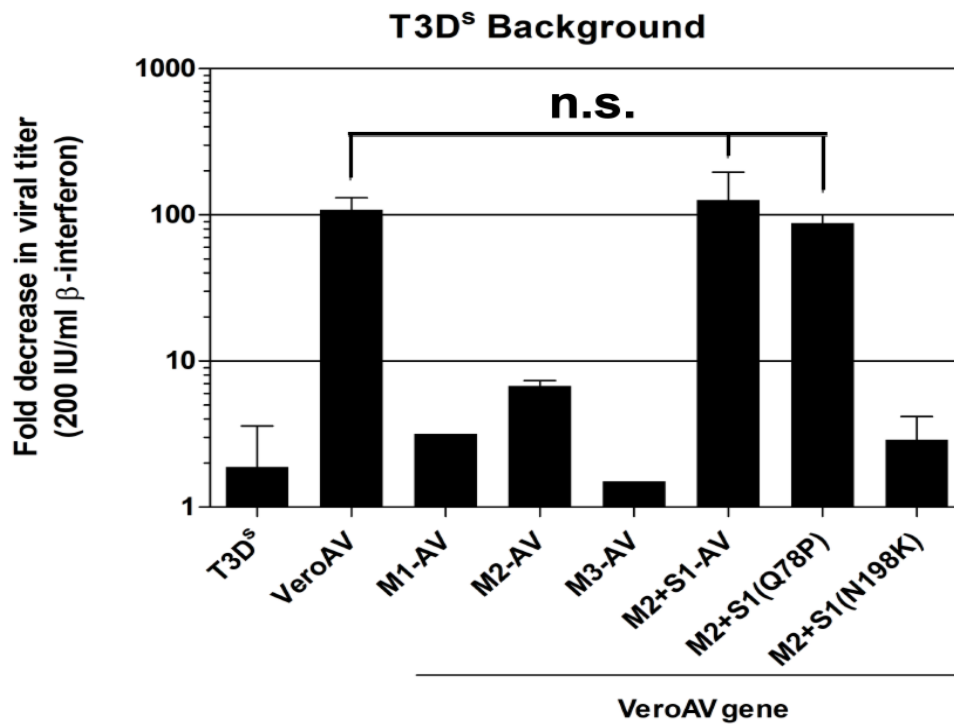
**Tableau IV. (Table 1)** Amino acids differences between wild-type reovirus type 3 Dearing laboratory stock (T3D<sup>S</sup>) and derived Vero-cell-adapted virus (VeroAV)

<b>Protein(gene)</b>	<b>Wild-type (T3D<sup>S</sup>)</b>	<b>VeroAV</b>	<b>Amino acid position</b>
<b>μ2(M1)</b>	<b>G</b>	<b>R</b>	<b>389</b>
<b>μ1(M2)</b>	<b>E</b>	<b>G</b>	<b>89</b>
	<b>A</b>	<b>V</b>	<b>114</b>
<b>μNS(M3)</b>	<b>D</b>	<b>N</b>	<b>706</b>
<b>σ1(S1)</b>	<b>Q</b>	<b>P</b>	<b>78</b>
	<b>N</b>	<b>K</b>	<b>198</b>
<b>σ1s(S1)</b>	<b>N</b>	<b>H</b>	<b>59</b>



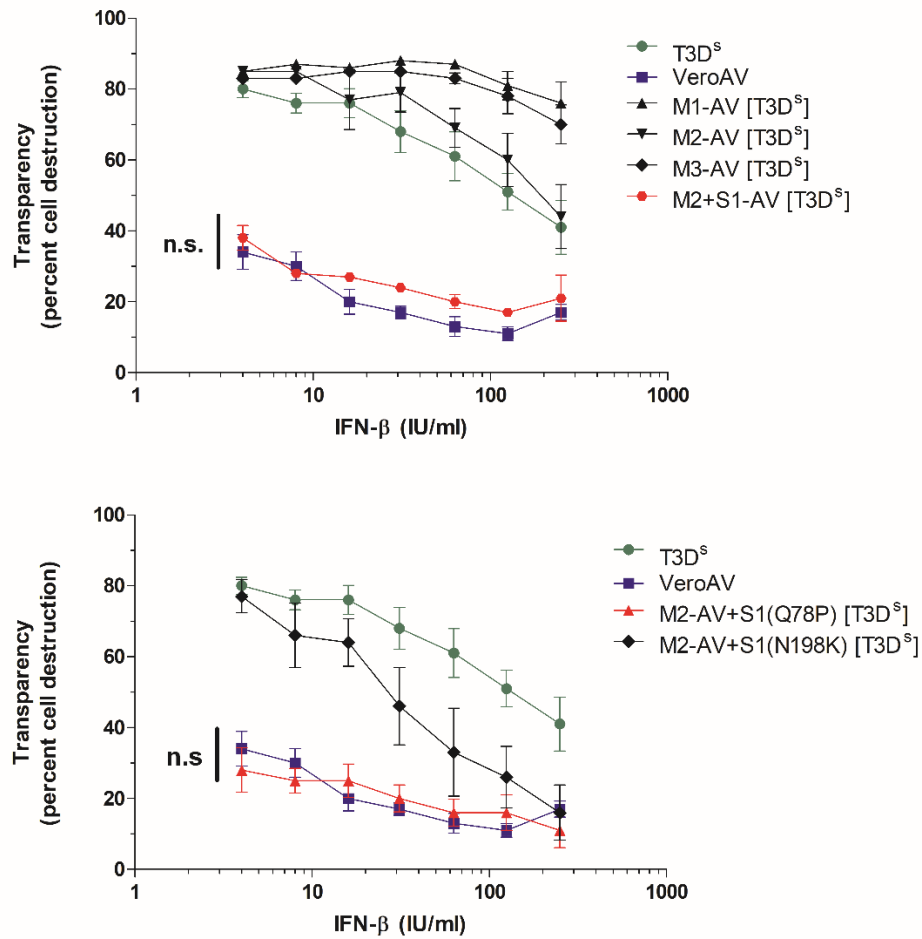
**Figure 1.** Comparison of interferon induction by the two rescued viruses.

L929 cells were infected at a MOI of 20 TCID<sub>50</sub> units per cell with either the rescued parental wild-type T3D<sup>s</sup> or the rescued VeroAV. Infected cells media were recovered at 15-hour post-infection and directly used in commercial ELISA assays, as described in Materials and methods. Quantitation of secreted β-interferon or α-interferons are presented, as indicated. Results are shown as the average of two independent experiments with error bars representing the standard error of the mean.



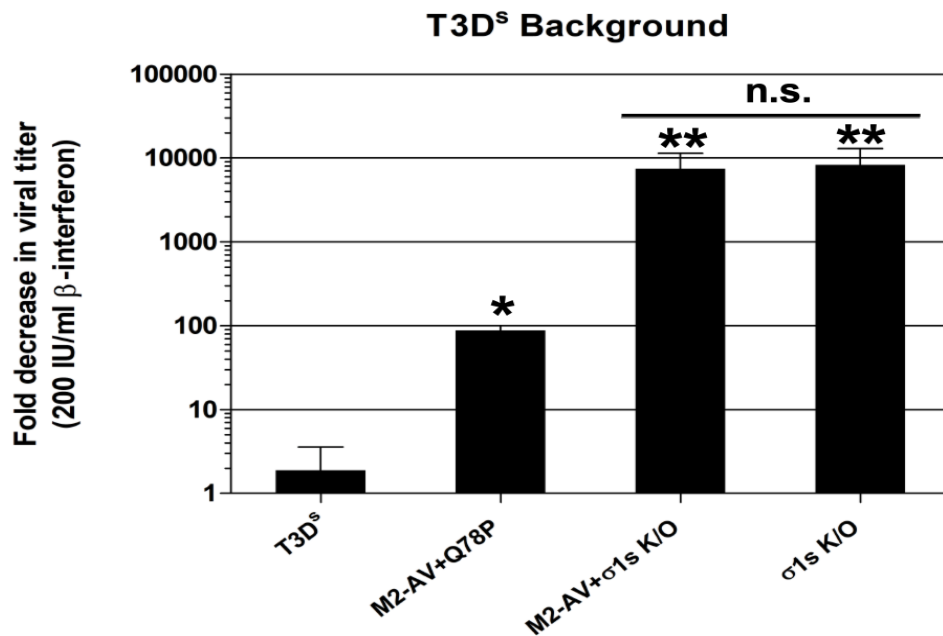
**Figure 2.** Interferon sensitivity of T3D<sup>S</sup> harboring VeroAV genes.

VeroAV genes were separately introduced in the T3D<sup>S</sup> background, except for the S1 gene that was introduced in combination with M2. Also, VeroAV S1 gene harboring either the two mutations corresponding to Q78P or N198K substitutions in  $\sigma$ 1 were separately introduced in the T3D<sup>S</sup> background in combination with VeroAV M2 gene. Virus titers in the absence or presence of 200 IU/ml of  $\beta$ -interferon were compared, as described in the text. Fold reductions in titers due to interferon presence are presented on a logarithmic scale. Error bars indicate the highest value obtained in two or more experiments. The two viruses that are not significantly different from VeroAV, using Student's t-test are indicated ( $p > 0.2$ ; n.s.), while others are significantly different ( $p < 0.01$ )



**Figure 3.** Sensitivity of reassortant viruses to different interferon concentrations.

The same viruses as in Fig. 2 were examined by the interferon dilution assay, as described in Materials and methods. The percentage of cell destruction, as determined by optical density of methylene blue stain compared to mock-infected cells, is presented, as described in Materials and methods. On the upper panel the two parental viruses are compared with viruses harboring a single gene reassortment or the M2-S1 combination while the lower panel presents the two single substitution mutants in S1. Results are presented as the average with error bars representing standard error of the mean ( $n=5$  for T3D<sup>S</sup> and VeroAV;  $n=2$  for other viruses in the upper panel and  $n=3$  for other viruses in the bottom panel). Using student's t-test to compare results at all different interferon concentrations, only two viruses M2+S1-AV [T3D<sup>S</sup>] and M2-AV+S1(Q78P) [T3D<sup>S</sup>] were nonsignificantly different from VeroAV ( $p>0.05$  at all concentrations), as indicated (n.s.).



**Figure 4.** Interferon sensitivity of the  $\sigma 1s$ -null (knockout) virus.

Viruses knockout (K/O) for the  $\sigma 1s$  protein (in the T3D<sup>S</sup> S1 gene) in the presence or absence of the VeroAV M2 gene, as described in the text, were compared with the Q78P mutant virus. Virus titers in the absence or presence of 200 IU/ml of  $\beta$ -interferon were compared, as described in the text. Fold reductions in titers due to interferon presence are presented on a logarithmic scale. Error bars indicate the highest value obtained in at least two replicate experiments. The difference between T3D<sup>S</sup> and the mutant was statistically significant at  $p < 0.0001$  (\*) while the difference between the mutant and either of the two K/O viruses was significant at  $p < 0.05$  (\*\*) using Student's t-test; there was no significant difference (n.s.) between the two K/O viruses ( $p > 0.5$ ).



## 8 Discussion et perspectives

Les premiers travaux réalisés dans notre laboratoire impliquant le virus « sauvage » T3D<sup>K</sup> et le mutant VeroAV avaient alors démontré que ces deux virus possédaient une sensibilité accrue à l'IFN par rapport à notre souche sauvage T3D<sup>S</sup>. L'approche par génétique inverse, maintenant adaptée à l'étude de réovirus depuis seulement une dizaine d'année, nous a permis d'identifier de manière plus précise les déterminants viraux responsables de ces phénotypes divergents. Un aspect intéressant et original de ce projet relève du fait que, outre l'équipe ayant initialement mise au point la technique de génétique inverse en 2007, nous sommes un des rares laboratoires à travers le monde à utiliser cette approche scientifique révolutionnaire.

### 8.1 Étude de l'induction et de la sensibilité à l'IFN chez T3D<sup>K</sup>

#### 8.1.1 Résumé

Le premier volet de ce projet s'intéressait à l'étude de deux souches dites « sauvage » de réovirus de sérotype 3 Dearing (T3D), soit le T3D<sup>K</sup> et le T3D<sup>S</sup>. Bien que de sérotype identique, ces deux virus sont très différents du point de vue de leurs séquences. Lorsqu'on les compare, on remarque d'ailleurs que dans 7 gènes sur 10, on retrouve des variations nucléotidiques menant à un changement d'acide aminé au niveau protéique (**Tableau II**). Dans le premier article, nous montrons d'abord que T3D<sup>K</sup> est non seulement plus sensible à l'IFN que T3D<sup>S</sup>, mais qu'il induit également chez les cellules infectées une production beaucoup plus importante d'IFN  $\beta$  et  $\alpha$ . Nous voulions maintenant vérifier s'il était possible d'associer le phénotype de sensibilité et d'induction d'IFN observé chez T3D<sup>K</sup> à une ou plusieurs de ses protéines.

Pour ce faire, nous avons bâti par génétique inverse des virus réassortants qui possèdent un des 7 gènes de T3D<sup>K</sup> différant de leur homologue T3D<sup>S</sup> ou une combinaison de certains de ces gènes, dans un fond génétique T3D<sup>S</sup>. À l'aide de différentes approches expérimentales, nous avons montré que les protéines  $\lambda 2$  et  $\mu 2$  de T3D<sup>K</sup> sont suffisantes et nécessaires pour récupérer le phénotype de sensibilité à l'IFN (**Figures 2 et 3**), alors que ses protéines  $\lambda 1$  et  $\mu 2$  sont responsables de sa capacité à plus fortement induire la production d'IFN chez les cellules

infectées (**Figure 4**). Cette étude démontre qu'il est possible de partiellement dissocier sur le plan génétique ces deux phénotypes qui semblent en apparence, interreliés.

## 8.1.2 Discussion

### 8.1.2.1 Les protéines $\mu 2$ , $\lambda 2$ et $\lambda 1$ ; mécanistique impliquée?

Une implication de la protéine  $\mu 2$  dans le contrôle de la réponse IFN avait déjà été recensée dans la littérature. En effet,  $\mu 2$  a d'abord été associée à l'induction d'IFN  $\beta/\alpha$  chez des cellules de myocarde ainsi qu'à une sensibilité concomitante du virus à cette réponse antivirale (Sherry et al., 1998). Des études subséquentes ont montré que l'acide aminé en position 208 sur la protéine  $\mu 2$  était associé à la répression des voies de signalisation IFN. Ainsi, lorsqu'une proline est en position 208 comme c'est le cas chez le T1L, on observe une accumulation « anormale » d'IRF9 au noyau de la cellule. Ceci prévient son interaction avec STAT 1 et 2 et empêche la formation du complexe ISGF3, nécessaire à la synthèse des ISGs. Au contraire, lorsqu'il y a une sérine à la même position, comme chez le T3D, ce phénomène n'est pas observé et les voies de signalisation IFN sont activées normalement (Irvin et al., 2012; Zurney et al., 2009).

De façon intéressante, même s'il est de sérotype 3, T3D<sup>S</sup> possède une proline en position 208 (**Tableau II**), ce qui laisse supposer que  $\mu 2$ -T3D<sup>S</sup> agit en fait comme  $\mu 2$ -T1L en inhibant considérablement la production d'IFN. Ainsi, les niveaux plus élevés de sensibilité et d'induction d'IFN chez T3D<sup>K</sup> et le rôle partiel que joue  $\mu 2$  dans ces deux phénotypes pourrait être associé à la présence d'une sérine en position 208.

Il ne va sans dire que la protéine  $\mu 2$  chez réovirus assure plusieurs autres fonctions. Par exemple, elle est connue pour être impliquée dans la morphologie des inclusions virales de par son interaction avec les microtubules (Parker et al., 2002). Cette propriété semble modifier l'efficacité de l'assemblage des particules virales et affecter le pourcentage de virions infectieux produits par les cellules infectées (Ooms et al., 2012; Shah et al., 2017). De plus, la protéine  $\mu 2$  a une capacité de liaison à l'ARN, aurait une fonction 5'ARN triphosphatase et donc posséderait possiblement un rôle à jouer dans la synthèse d'ARN (Brentano et al., 1998; Noble and Nibert, 1997b). Il sera intéressant de vérifier si une ou plusieurs de ces différentes propriétés pourraient être en lien avec le contrôle de la réponse IFN.

La sensibilité accrue de T3D<sup>K</sup> par rapport à T3D<sup>S</sup> est également due à une autre différence d'acide aminé se situant dans la protéine  $\lambda 2$ . Cette substitution est localisée dans le premier domaine méthyltransférase de la protéine (a.a. 434 à 691), précisément en position 504 (**Tableau II**). De manière intéressante, notre équipe a récemment montré qu'une simple substitution d'acide aminé dans ce même domaine en position 636 est associée avec l'hypersensibilité à l'IFN observée chez un virus mutant (Sandekian and Lemay, 2015b). Lorsqu'on examine la structure cristallographique de la protéine  $\lambda 2$ , on remarque que ces deux positions sont très près l'une de l'autre au niveau de la structure protéique (**Figure 5**). Il est donc raisonnable de penser que des substitutions en positions 504 et 636 puissent avoir un effet similaire au niveau moléculaire, mais le réel impact mécanistique de telles mutations reste toujours à prouver. Il est possible que ces mutations altèrent le passage des ARNm lorsque ceux-ci sortent du core à travers les tourelles formées de pentamères de  $\lambda 2$ . D'autre part, ces mutations sont situées dans le domaine méthyltransférase qui semble être responsable de la 2'O méthylation, il est donc possible qu'elles affectent la synthèse de la coiffe sur les ARN messagers viraux. Bien que la fonction exacte de la 2'O méthylation demeure encore incertaine, il est clair qu'il s'agit d'un mécanisme d'évasion mis en branle par les virus pour que leur matériel génétique passe « incognito » au sein de la cellule infectée. En effet, lorsque les virus perdent cette fonction, ils deviennent beaucoup plus sensibles et susceptibles aux effets antiviraux de la réponse IFN, notamment aux protéines IFIT (Daffis et al., 2010; Zust et al., 2011).

Afin de déterminer si une altération de l'activité 2'O méthyltransférase de la protéine  $\lambda 2$  chez T3D<sup>K</sup> pourrait expliquer en partie sa sensibilité accrue à l'IFN, il serait intéressant d'étudier plus en détail la composition des extrémités 5' de ses ARNm. Il serait en effet pertinent de voir s'il existe des variations biochimiques au niveau de la coiffe entre le T3D<sup>K</sup> et le T3D<sup>S</sup>. Les virus construits par génétique inverse dans cette étude, notamment le L2-T3D<sup>K</sup> [T3D<sup>S</sup>], pourraient même nous permettre de savoir si ces éventuels changements seraient simplement dus à la substitution E504G dans la protéine  $\lambda 2$  de T3D<sup>K</sup>.

Finalement, la forte induction d'IFN générée lors d'une infection par le T3D<sup>K</sup> par rapport au T3D<sup>S</sup> est non seulement due à  $\mu 2$ , mais également à la présence d'une substitution d'acide aminé dans la protéine  $\lambda 1$  (S500I) (**Tableau II**). Il s'agit ici d'un aspect original de cette étude

puisque c'est, à notre connaissance, la première fois qu'un lien est établi entre la protéine  $\lambda 1$  de réovirus et le contrôle de la réponse IFN.

Bien que la fonction exacte de  $\lambda 1$  dans un réel contexte d'infection ne soit pas encore claire, des études biochimiques ont permis de découvrir que cette protéine contient un motif de liaison aux acides nucléiques et qu'elle aurait une activité hélicase et 5'ARN triphosphatase (Bisaillon et al., 1997; Bisaillon and Lemay, 1997; Lemay and Danis, 1994; Noble and Nibert, 1997a). Il est donc suggéré que  $\lambda 1$  puisse être, entre autres, impliquée au niveau de la réplication, de la transcription et de la synthèse de la coiffe des ARNm.

Des travaux ultérieurs seront donc nécessaires pour accroître nos connaissances sur le mécanisme d'action de  $\lambda 1$ , précisément chez des virus comme T3D<sup>K</sup> et T3D<sup>S</sup> chez lesquels elle semble avoir un fonctionnement différent. Il sera important de vérifier si la protéine  $\lambda 1$ -T3D<sup>S</sup> permet un contrôle de la réponse IFN ou au contraire si la substitution d'acide aminé fait en sorte que la protéine  $\lambda 1$ -T3D<sup>K</sup> contribue positivement à l'induction d'IFN. Éventuellement, les protéines  $\lambda 1$ -T3D<sup>S</sup> et  $\lambda 1$ -T3D<sup>K</sup> pourraient être exprimées chez des cellules dont les voies IFN seraient stimulées par du poly (I :C). Des immunobuvardages de type Western permettraient par la suite de vérifier si la quantité protéique de différents ISGs ou facteurs de transcription diffère en présence de  $\lambda 1$ -T3D<sup>S</sup> ou  $\lambda 1$ -T3D<sup>K</sup>. Cette procédure expérimentale pourrait peut-être nous en apprendre davantage sur leur mécanisme d'action respectif.

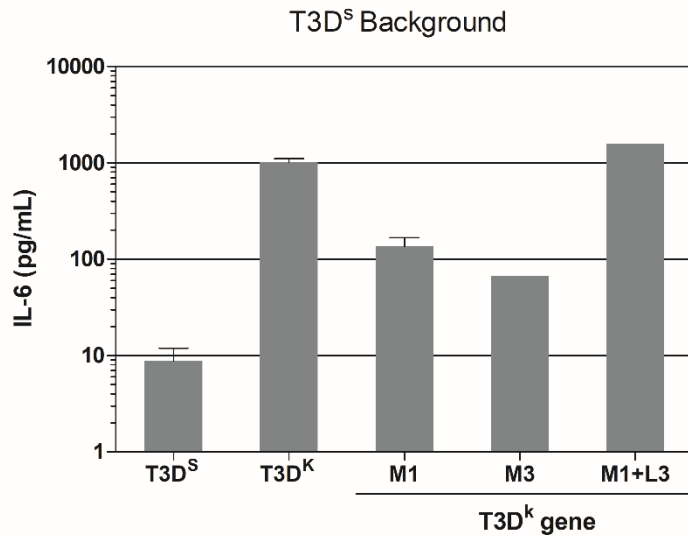
Il est aussi intéressant de noter que différents niveaux d'activité ATPase au sein du core ont été observés entre la souche T1L et T3D (Noble and Nibert, 1997a). En effet, T1L hydrolyse beaucoup plus rapidement l'ATP que T3D et ces variations seraient potentiellement dues à l'une ou plusieurs des 5 substitutions d'acide aminé observées entre ces deux sérotypes se situant dans la protéine  $\lambda 1$  ; L71M, E215D, S500I, V1011I et M1100L (Harrison et al., 1999). De façon intéressante, on retrouve en position 500 de la protéine  $\lambda 1$  de T3D<sup>S</sup> une sérine (comme T1L), alors que chez T3D<sup>K</sup> il s'agit d'une isoleucine (comme T3D). Il peut donc être hypothétiquement envisagé que la protéine  $\lambda 1$ -T3D<sup>S</sup> hydrolyse plus rapidement l'ATP que  $\lambda 1$ -T3D<sup>K</sup>, qui elle permettrait plutôt une plus grande accumulation d'ATP au niveau cellulaire.

### 8.1.2.2 L'activité ATPase virale en lien avec l'induction d'IFN?

Un article paru récemment montre l'effet protecteur de l'ATP dans un contexte d'infection virale. En effet, l'ATP extracellulaire produite par les cellules infectées agirait comme un signal de danger et permettrait d'augmenter la réponse immunitaire *in vitro* et *in vivo* envers des virus tels que VSV, le virus de New Castle et le HSV en augmentant la production d'IFN- $\beta$  (Zhang et al., 2017). Les résultats montrent que cette augmentation de production d'IFN- $\beta$  est P2X7-dépendante et résulte de l'activation de la voie de signalisation P38/JNK/ATF-2, une voie alternative menant à la production d'IFN- $\beta$ .

Malgré que son mécanisme d'action exact dans un contexte d'infection virale demeure inconnu, les études suggèrent que le récepteur de l'ATP, appelé P2X7, soit essentiel à plusieurs aspects de la réponse immunitaire innée. Le récepteur P2X7 est d'ailleurs connu pour être responsable de la relâche de cytokines inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-2, l'IL-6 et l'IL-18 (Wiley et al., 2011).

De façon intéressante, lorsque nous avons vérifié les différents niveaux d'induction d'IFN  $\beta$  et  $\alpha$  sécrétés par les cellules infectées par T3D<sup>K</sup> et T3D<sup>S</sup>, nous avons également examiné si ces virus permettaient d'induire plus ou moins fortement de l'interleukine-6 (IL-6). En effet, des voies de signalisation alternatives reliées à l'IFN permettent d'activer le facteur de transcription NF- $\kappa$ b, menant à la synthèse d'IL-6 (Pfeffer, 2011). Des résultats préliminaires montrent que tout comme les IFNs, la quantité d'IL-6 produite par les cellules infectées par T3D<sup>K</sup> est plus élevée que lorsque celles-ci sont infectées par le T3D<sup>S</sup>. Il est d'autant plus intéressant d'observer que le réassortant M1+L3-T3D<sup>K</sup> [T3D<sup>S</sup>], associé à la forte induction d'IFN, permet aussi de récupérer le plein phénotype d'induction d'IL-6 observé avec le virus complet (**Figure 1**).



**Figure 1.** Induction d'interleukine-6 par différents réassortants viraux

Les cellules L929 ont été infectées à une MOI de 20. Le surnageant des cellules infectées a été récupéré 15 heures post-infection et directement analysé par Elisa. Certains des résultats sont présentés comme étant la moyenne de deux expériences indépendantes avec des barres d'erreurs représentant le SEM.

À la lumière de ces informations, il serait intéressant de vérifier si, comme dans le cas de différents virus comme le VSV, le T3D<sup>K</sup> est associé à une augmentation significative d'ATP extracellulaire. Cela pourrait s'avérer plausible, car tel que mentionné plus haut,  $\lambda$ 1-T3D<sup>K</sup> favoriserait hypothétiquement une accumulation d'ATP dans l'environnement cellulaire. Il y a aussi le fait qu'une grande concentration d'ATP (> 100  $\mu$ M) est nécessaire pour activer le récepteur transmembranaire P2X7, qui assure notamment la sécrétion d'IL-6 dans le milieu (Wiley et al., 2011). Finalement, comme il a été démontré qu'une plus grande quantité d'ATP permet également une plus forte induction d'IFN, il serait d'autant plus pertinent d'examiner si des cellules infectées par T3D<sup>K</sup> génèrent plus d'ATP extracellulaire que celles infectées par T3D<sup>S</sup>.

### 8.1.2.3 Concept de « souche sauvage »

Cet article amène finalement à réfléchir sur la véritable définition du terme « souche sauvage » chez le réovirus. Bien qu'il ne s'agisse pas du virus le plus susceptible aux mutations et aux modifications génétiques spontanées, il n'en demeure pas moins que réovirus possède un

génomique à ARN, le rendant ainsi plus sujets à ce genre de changements qu'un quelconque virus ADN. Il a d'ailleurs été montré qu'il existe une grande variété de souches différentes au sein même du sérotype 3 (Sandekian and Lemay, 2015b). Il est fort probable que plusieurs de ces variations génétiques n'occasionnent pas de différences phénotypiques, mais il n'en demeure pas moins que certains de ces changements pourraient expliquer certains caractères observables, comme c'est le cas pour le T3D<sup>K</sup> et l'IFN. L'impact des substitutions d'acide aminé d'une souche à l'autre n'est pas à sous-estimer. En effet, des études ont rapporté leur importance au niveau de la décapsulation du virus (G198E sur la protéine  $\sigma 3$ ) (Doyle et al., 2012), de la répression des voies reliées à l'IFN et de la morphologie des inclusions virales (P208S sur la protéine  $\mu 2$ ) (Irvin et al., 2012; Parker et al., 2002) ou encore de l'acquisition d'une sensibilité accrue à l'IFN (T636M sur la protéine  $\lambda 2$ ) (Sandekian and Lemay, 2015b).

Finalement, cet article rappelle qu'il est primordial de faire preuve de vigilance dans la comparaison de souches virales présentant des différences au niveau génétique. Heureusement, avec la venue de la génétique inverse, il est maintenant plus facile et accessible pour tous de travailler avec des virus génétiquement caractérisés.

### 8.1.3 Autres perspectives

En plus des différentes perspectives discutées ci-haut en lien avec les protéines de réovirus impliquées dans les phénotypes de sensibilité et d'induction d'IFN observés chez le T3D<sup>K</sup> par rapport au T3D<sup>S</sup>, il serait également pertinent de s'attarder aux changements que cause l'infection de ces deux virus chez les cellules. Il serait notamment intéressant d'étudier les variations qu'occasionnent les deux virus au niveau du protéome cellulaire. Une étude a d'ailleurs montré que l'infection par le sérotype 3 (T3D) entraînait une plus forte activation de la voie IFN que T1L. En effet, cette équipe a observé que les quantités protéiques de STAT1 et d'ISGs tels qu'ISG15, IFIT et MX1 sont beaucoup plus élevés lors d'une infection par T3D que par T1L (Ezzati et al., 2015). Tel que mentionné plus haut, les protéines  $\mu 2$  et  $\lambda 1$  de T3D<sup>S</sup> comportent des mutations retrouvées habituellement chez le T1L. Il est donc tentant de supposer que la moins bonne capacité du T3D<sup>S</sup> à induire les voies IFN pourrait se refléter dans de faibles quantités de protéines cellulaires antivirales alors que la forte production d'IFN provoquée par le T3D<sup>K</sup> concorderait sans doute avec des niveaux bien plus élevés de ces mêmes protéines.

D'autre part, les méthodes d'analyse moléculaire sont en plein essor et il ne va sans dire que le séquençage d'ARN (*RNAseq*) est parmi celles-ci. Cette approche a récemment permis d'observer que l'infection par réovirus affecte de manière significative le patron d'épissage alternatif que subissent plusieurs ARN pré-messagers cellulaires (Boudreault et al., 2016; Rivera-Serrano et al., 2017). De façon intéressante, la première étude révèle que les modifications au niveau de l'épissage sont toutefois les mêmes dans des cellules infectées par T3D<sup>S</sup> et P4L-12, un virus mutant hypersensible à l'IFN mais qui n'induit pas plus les voies de signalisation qui y sont reliées. On pourrait penser à réaliser le même genre d'analyse avec T3D<sup>K</sup> pour vérifier si les résultats obtenus seraient différents avec un virus qui, cette fois, induit fortement la production d'IFN. L'utilisation des réassortants construits par génétique inverse, tel que M1+L3-T3D<sup>K</sup> [T3D<sup>S</sup>], pourrait totalement être justifiée afin de confirmer qu'une éventuelle différence serait, par exemple, due aux gènes responsables de l'induction d'IFN.

Finalement, afin de vérifier si la sensibilité accrue du T3D<sup>K</sup> à l'IFN est due à une susceptibilité envers un ou plusieurs ISGs en particulier, il pourrait être intéressant de réaliser un screening et d'utiliser une librairie de shRNA dirigés contre différents ISGs. Une augmentation de la résistance du virus face à l'IFN dans des cellules où la synthèse d'un ISG spécifique est empêchée par un shRNA pourrait permettre de mieux cibler le mécanisme d'action cellulaire impliqué dans le phénotype de sensibilité à l'IFN de T3D<sup>K</sup> et de réassortants tels que M1+L2-T3D<sup>K</sup> [T3D<sup>S</sup>].



## 8.2 Étude de la sensibilité à l'IFN chez VeroAV

### 8.2.1 Résumé

Grâce au phénomène de persistance virale, le mutant Vero-cell-adapted virus (VeroAV) a été obtenu au laboratoire. Les premières études ont montré que ce virus avait une meilleure capacité de liaison aux acides sialiques présents à la surface des cellules et une plus grande sensibilité à l'IFN que le virus duquel il découle, le T3D<sup>S</sup> (Jabre et al., 2013; Sandekian and Lemay, 2015a). Suite au séquençage complet du mutant, des substitutions d'acide aminé ont été trouvées dans 5 protéines ( $\mu$ 1,  $\mu$ 2,  $\mu$ NS,  $\sigma$ 1 et  $\sigma$ 1s). Nous avons donc premièrement utilisé la mutagenèse dirigée afin d'introduire les mutations trouvées chez VeroAV sur les plasmides portant initialement les gènes de T3D<sup>S</sup>. Cela nous a permis de récupérer un VeroAV bâti par génétique inverse présentant les mêmes propriétés que le virus original isolé par persistance virale, notamment une plus grande sensibilité à l'IFN que le T3D<sup>S</sup>. Nous avons cependant observé que les niveaux d'induction d'IFN sont semblables chez les cellules infectées par VeroAV ou T3D<sup>S</sup>. Afin de poursuivre l'investigation relative au phénotype de sensibilité, nous avons ensuite construit des premiers réassortants qui ont permis de diriger nos efforts subséquents vers le gène S1. Les deux mutations présentes dans le gène S1 de VeroAV (Q78P et N198K) ont par la suite été séparées lorsque nous avons bâti d'autres réassortants possédant cette fois une seule de ces deux mutations. Les résultats indiquent que la mutation Q78P/N59H, retrouvée respectivement dans la protéine  $\sigma$ 1 et  $\sigma$ 1s serait responsable du phénotype de sensibilité à l'IFN observé chez VeroAV.

### 8.2.2 Discussion

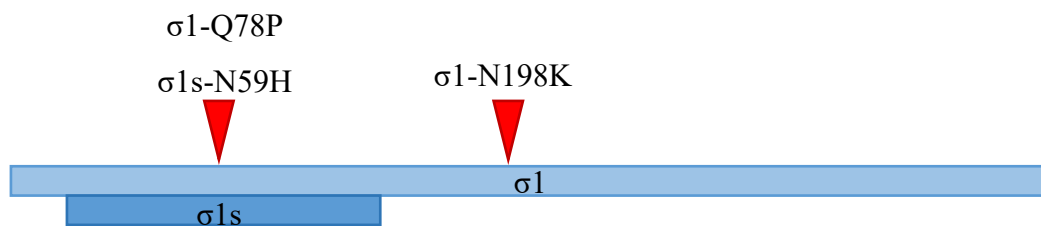
#### 8.2.2.1 Une induction d'IFN semblable à celle du T3D<sup>S</sup>

Nous avons d'abord montré que VeroAV est un mutant sensible à l'effet antiviral de l'IFN, mais que l'infection par ce virus n'occasionne pas une plus forte production d'IFN au niveau des cellules infectées que le T3D<sup>S</sup> (**Figure 1**). Tel que mentionné plus haut, la plus forte induction d'IFN observée avec T3D<sup>K</sup> serait potentiellement due à la présence d'une sérine en

position 208 sur la protéine  $\mu 2$ . Or, lorsqu'on regarde les mutations présentes chez VeroAV, on constate que la position 208 sur  $\mu 2$  n'est pas mutée (**Tableau III**). Comme chez T3D<sup>S</sup>, cette position est occupée par une proline, et donc associée avec une répression des voies reliées à l'IFN (Irvin et al., 2012). Il semble que la substitution retrouvée plus loin en position 389 sur  $\mu 2$ -AV n'ait donc, quant à elle, aucun impact en ce concerne l'induction d'IFN.

### 8.2.2.2 Les mutations sur le gène S1 de VeroAV ; un lien?

En utilisant l'approche de génétique inverse, nous avons montré que la mutation Q78P/N59H affectant respectivement la protéine  $\sigma 1$  et  $\sigma 1s$ , serait responsable du phénotype de sensibilité à l'IFN observé chez VeroAV. Rappelons que le gène S1 de réovirus est le seul parmi les 10 gènes qui code pour deux protéines distinctes selon un cadre de lecture différent.



**Figure 2.** Mutations retrouvées chez VeroAV au niveau des protéines  $\sigma 1$  et  $\sigma 1s$ , codées par le gène S1.

Dans un premier temps, il est pertinent de s'attarder au lien qu'il pourrait y avoir entre les deux mutations présentes dans le gène S1 de VeroAV. De manière intéressante, une étude a montré qu'un mutant ayant été obtenu suite à l'adaptation de réovirus sur des cellules MEL (*murine erythroleukemia*) possédait également deux mutations dans le gène S1. En effet, ce virus adapté aux cellules MEL ne produisait plus la protéine  $\sigma 1s$  en raison de l'introduction d'un codon stop au début de la protéine. Les auteurs avaient également dénoté la substitution d'un tryptophane pour une arginine en position 202 sur  $\sigma 1$  (Rodgers et al., 1998). De façon intéressante, les acides aminés situés en position 198 et 202 font partie du domaine de liaison aux acides sialiques (Chappell et al., 1997). Il est tentant de supposer que le changement d'une asparagine pour une lysine basique chez VeroAV (N198K) et le changement d'un tryptophane

pour une arginine basique chez le mutant adapté aux cellules MEL (W202R) pourraient favoriser une meilleure infectivité en permettant un meilleur attachement aux acides sialiques, chargés négativement. Ceci pourrait contrebalancer l'altération ou la perte de  $\sigma 1s$ . En effet, nous avons observé que la seule introduction de la mutation N59H ou l'introduction d'un codon stop dans le cadre de lecture de  $\sigma 1s$  diminuait la capacité du virus à lyser les cellules L929 (fibroblastes de souris) infectées. À noter que lors du processus de persistance virale ayant permis l'obtention de Ver $\alpha$ AV, il semble que la mutation N198K soit apparue avant la mutation Q78P/N59H (Sandekian and Lemay, 2015a). Cela serait hypothétiquement plausible, en considérant qu'une meilleure infectivité soit préalablement requise pour permettre l'introduction d'une mutation subséquente pouvant possiblement altérer la fonction et ou la quantité de  $\sigma 1s$ .

### 8.2.2.3 $\sigma 1s$ contribue à la synthèse optimale des protéines virales

En accord avec l'idée que  $\sigma 1s$  puisse avoir un certain rôle à jouer dans la capacité du virus à infecter les cellules, une étude récente montre que cette protéine non-structurale serait requise pour l'expression optimale des protéines de réovirus durant l'infection, permettant ainsi une meilleure réplication virale (Phillips et al., 2018b). En effet, les auteurs affirment que  $\sigma 1s$  n'est pas nécessaire pour les premières étapes de l'infection, mais que les niveaux de protéines virales sont plus élevés lors d'une infection par le Wt (*wild-type*) que par le mutant  $\sigma 1s$ -KO. Ils ont aussi remarqué que, bien que suffisante pour permettre de faibles niveaux de réplication virale, la formation des inclusions virales est altérée lors d'une infection par le mutant  $\sigma 1s$ -KO. La production de virions infectieux est donc considérablement réduite, expliquant les titres viraux moins élevés obtenus avec le mutant par rapport au Wt. Les auteurs affirment que  $\sigma 1s$  n'est toutefois pas requise pour l'induction de la réponse IFN de type 1, puisque les niveaux d'IFN- $\beta$  produits, de STAT1 et STAT2 cellulaires et d'IFIT1 sont semblables lors d'une infection par le Wt et le mutant  $\sigma 1s$ -KO. N'ayant toutefois pas vérifié si leur mutant  $\sigma 1s$ -KO était plus sensible à l'action antivirale de l'IFN, il ne peut pas être exclu que la réduction de la synthèse protéique observée avec un mutant  $\sigma 1s$ -KO ne soit en lien avec une plus grande sensibilité à l'IFN. Il est toutefois important de souligner que cette étude a été réalisée avec la souche T1L et non T3D. Tel que déjà mentionné, la précaution est de mise dans l'interprétation et la comparaison de résultats provenant de souches de réovirus qui diffèrent sur le plan

génétique. Il serait intéressant de voir si les résultats de cette étude peuvent également être obtenus avec nos virus T3D dans un contexte d'infection de cellules L929.

#### **8.2.2.4 $\sigma$ 1s serait impliquée dans la sensibilité du virus à l'action antivirale de l'IFN**

En utilisant les virus réassortants bâtis au cours de cette étude, nous avons remarqué que la seule présence de la mutation Q78P/N59H permettait de récupérer le phénotype complet de sensibilité de VeroAV (**Figures 2 et 3**). Tel que déjà mentionné, la mutation Q78P/N59H retrouvée chez VeroAV affecte respectivement sa protéine  $\sigma$ 1 et sa protéine  $\sigma$ 1s. Cependant, nous avançons l'hypothèse que ce serait l'impact de la mutation N59H sur la protéine  $\sigma$ 1s qui serait responsable du phénotype de sensibilité à l'IFN observé chez VeroAV. En effet, en observant les diminutions des titres viraux en présence d'une concentration fixe d'IFN, nous remarquons que l'absence complète de  $\sigma$ 1s chez le virus T3D<sup>S</sup> occasionne l'apparition d'une sensibilité excessivement importante à l'IFN, plus grande encore que celle observée avec VeroAV et le réassortant M2-AV+Q78P [T3D<sup>S</sup>] (**Figure 4**).

Des expériences préliminaires faites avec certains réassortants suggèrent qu'il n'y aurait pas de lien entre la quantité de  $\sigma$ 1s exprimée et la sensibilité de ces différents virus à l'IFN. Nous supposons donc que la mutation touchant  $\sigma$ 1s chez VeroAV causerait plutôt une altération fonctionnelle de la protéine.

Lorsque l'on s'attarde au changement d'acide aminé que la mutation occasionne en position 59 sur  $\sigma$ 1s, on remarque premièrement qu'une asparagine (N) non chargée est substituée pour une histidine (H) basique. De plus, lorsqu'on compare la structure moléculaire de ces deux acides aminés, on constate que l'histidine, contrairement à l'asparagine, possède un cycle imidazole à l'extrémité de sa chaîne latérale. Il peut être envisagé qu'un changement de polarité ou la présence d'une structure comme un cycle imidazole puisse venir modifier la conformation tridimensionnelle d'une petite protéine comme  $\sigma$ 1s, composée de seulement 120 a.a, et ainsi altérer sa fonction. Il sera éventuellement intéressant de vérifier si l'impact structural de la substitution N59H peut être observé par cristallographie (non disponible pour l'instant).

### 8.2.2.5 Une découverte surprenante

Nous avons été étonnés de constater la possible implication de  $\sigma 1s$  dans le phénotype de sensibilité à l'IFN observé chez VeroAV. En effet, c'est la première fois qu'un lien potentiel est établi entre cette protéine et la réponse antivirale IFN. On connaît depuis un certain temps son rôle dans la dissémination du virus *in vivo*. En effet, cette petite protéine serait nécessaire à la dissémination systémique du virus au niveau sanguin et à l'établissement d'une virémie chez l'animal infecté (Boehme et al., 2011; Boehme et al., 2009). Certains proposent que la capacité de  $\sigma 1s$  à potentialiser la synthèse protéique puisse expliquer ce phénomène (Phillips et al., 2018b). De futures études seront nécessaires afin de vérifier si l'importance de  $\sigma 1s$  dans la propagation virale *in vivo* pourrait être due à son implication dans le contrôle de la réponse IFN.

Des études ont également montré que  $\sigma 1s$  était nécessaire pour provoquer l'arrêt du cycle cellulaire en phase G(2)/M lors d'une infection par réovirus (Poggioli et al., 2000). De façon intéressante, dans un très récent article on mentionne que l'arrêt du cycle cellulaire en phase G(2)/M inhibe fortement la production d'IFN de type I et III ainsi que l'expression des ISGs suite à l'ajout exogène d'IFN (Bressy et al., 2018). Il pourrait donc être hypothétiquement avancé que la mutation N59H retrouvée dans  $\sigma 1s$ -AV diminue la capacité fonctionnelle de cette protéine à restreindre la production d'IFN et la synthèse d'ISGs, ce qui pourrait potentiellement expliquer la sensibilité accrue à l'IFN observée chez ce virus mutant. Cette théorie resterait toutefois à valider, puisque nous n'avons pas vu de différence dans la capacité du T3D<sup>S</sup> et VeroAV à induire la production d'IFN  $\beta$  et  $\sigma$ .

### 8.2.3 Autres perspectives et difficultés rencontrées

Lorsque nous en sommes venus à confirmer le rôle de  $\sigma 1s$  dans le phénotype de sensibilité à l'IFN observé chez VeroAV, nous avons tenté de réaliser une expérience de complémentation. En effet, nous avons utilisé un système de vecteur rétroviral permettant l'expression de  $\sigma 1s$ -T3D<sup>S</sup> et de  $\sigma 1s$ -AV au sein de cellules L929 transfectées. Le but était, par la suite, d'infecter ces cellules avec le virus  $\sigma 1s$ -KO [T3D<sup>S</sup>]. Nous voulions alors observer si la complémentation du virus par la forme sauvage et la forme mutante de  $\sigma 1s$  permettrait de récupérer des niveaux différents de résistance à l'IFN. Or, il s'avère que nous avons éprouvé quelques difficultés à réaliser ce genre d'expérience. Premièrement, malgré que nos cellules

L929 transfectées survivaient lors de l'étape de la sélection à l'hygromycine, signe que l'insert s'était bien intégré au niveau du génome cellulaire, nous étions incapables de détecter la présence de  $\sigma 1s$  par western. Évidemment, l'expérience subséquente de complémentation avec le virus  $\sigma 1s$ -KO [T3D<sup>S</sup>] ne permis pas d'obtenir de résultats concluants. À noter qu'une autre équipe ayant réalisé des expériences de complémentation avec des cellules qui, supposément, expriment  $\sigma 1s$ , n'ont également pas réussi à voir la protéine par western (Phillips et al., 2018b).

Face à cette problématique, il peut être envisagé que la protéine  $\sigma 1s$  ait un effet toxique pour la cellule. Tel que mentionné, cette protéine de réovirus est connue pour être impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire, mais aussi dans l'induction de l'apoptose lors d'une infection (Boehme et al., 2013). Il pourrait donc être envisagé, éventuellement, d'utiliser un système d'expression inductible tel que Tet-Off ou Tet-On. Cela pourrait permettre de mieux contrôler l'expression de  $\sigma 1s$  dans les cellules transfectées, rendant ainsi possible sa détection par western et la réalisation d'expériences de complémentation concluantes.

En somme, l'approche par génétique inverse et la construction de multiples réassortants nous ont permis d'identifier une mutation sur le gène S1 de VeroAV étant responsable de son phénotype de sensibilité à l'IFN. Cette mutation provoque à la fois un changement d'acide aminé dans la protéine  $\sigma 1$  (Q78P) et dans la protéine  $\sigma 1s$  (N59H). De premiers résultats, impliquant notamment des virus  $\sigma 1s$ -KO, laissent suggérer qu'un déficit fonctionnel de la protéine  $\sigma 1s$  de VeroAV, occasionné par la substitution N59H, puisse être à l'origine de sa sensibilité accrue aux effets antiviraux de la réponse IFN. Des études ultérieures devront être menées afin de confirmer cette théorie.

### **8.3 Avenues connexes : oncotropisme**

Tel que mentionné dans l'introduction de ce mémoire, la réponse IFN et les voies de signalisation qui lui sont reliées sont connues pour être souvent déficientes au sein des cellules cancéreuses. Il est donc évident qu'une meilleure compréhension des déterminants de l'induction et/ou de la sensibilité des virus face à cette réponse antivirale pourrait permettre d'optimiser les souches oncolytiques, tel que réovirus (Mohamed et al., 2015).

À titre d'exemple, il a été montré que la sensibilité accrue d'un virus mutant à l'IFN corrélait avec sa capacité à mieux infecter des cellules NIH-3T3 transformées par Ras que des cellules NIH-3T3 parentales (Rudd and Lemay, 2005). Il est tentant de supposer que les virus T3D<sup>K</sup> et VeroAV puissent avoir également une activité oncolytique supérieure au virus sauvage T3D<sup>S</sup>, étant donné leur phénotype d'induction et de sensibilité à l'IFN. Il pourrait être intéressant dans le futur d'observer si, en effet, ces virus se répliquent mieux et parviennent à détruire de manière préférentielle des cellules transformées par Ras par rapport à celles qui ne le sont pas.

D'autre part, le concept d'identifier les déterminants géniques qui sont spécifiquement impliqués dans la sensibilité et/ou le contrôle de la réponse IFN, mène indéniablement à l'idée de combiner ces mutations sur un seul et même virus et d'en observer les impacts. À l'aide de la génétique inverse, il s'agit là certes d'une idée réalisable. Reste à voir si la pression qu'occasionnerait la combinaison de telles mutations permettrait l'obtention de virus réassortants viables en bout de ligne.

Finalement, il pourrait être envisagé d'utiliser la persistance virale comme outil pour obtenir des virus possédant des propriétés intéressantes dans un contexte de virothérapie. Tel que mentionné dans la section 3.2 de l'introduction, la persistance virale résulte d'une co-évolution virus-cellule obtenue suite à une interaction prolongée. Cela se traduit notamment par l'obtention d'un virus mieux adapté aux cellules en question et présentant une meilleure infectivité envers celles-ci.

En établissant une persistance virale sur une lignée de cellules cancéreuses, il pourrait donc être possible, en théorie, de générer des mutants viraux mieux adaptés à infecter ces cellules cancéreuses. À titre d'exemple, plusieurs cellules malignes masquent ou sous-expriment JAM-A, un récepteur de réovirus (Gutwein et al., 2009; Naik et al., 2008). On pourrait penser que d'établir une persistance virale sur ce genre de cellules pourrait permettre d'obtenir en bout de ligne un virus adapté, ayant acquis de nouvelles propriétés lui permettant d'infecter efficacement ces cellules, malgré la faible quantité de JAM-A à leur surface.

Dans le même esprit que les travaux présentés dans ce mémoire, le séquençage et la génétique inverse pourraient ensuite permettre de mettre en lumière les déterminants géniques favorisant un meilleur oncotropisme.

## 9 Conclusion

Les travaux réalisés ont permis de mettre en lumière l'utilité, mais surtout l'accessibilité de la génétique inverse dans la caractérisation de mutants viraux. En effet, cette approche nous a permis d'identifier les déterminants viraux responsables des phénotypes d'induction et de sensibilité à l'IFN observés chez les virus T3D<sup>K</sup> et VeroAV.

Le fait que les protéines virales  $\mu 2$  et  $\lambda 2$  soient impliquées dans ces phénotypes est apparu logique et supporté par des données précédemment recensées dans la littérature. L'implication de  $\lambda 1$  et  $\sigma 1s$  nous est toutefois apparu comme une découverte surprenante au cours de cette étude. C'est à notre connaissance, la première fois qu'un lien est établi entre ces protéines virales et le contrôle de la réponse IFN chez réovirus. Des études subséquentes seront nécessaires afin de mieux comprendre leur mécanisme d'action respectif.

Cela ne fait que renforcer l'idée selon laquelle plusieurs protéines de réovirus peuvent être impliquées dans le contrôle de la réponse IFN et dans la sensibilité du virus à celle-ci. Nous avons également montré que bien que ces phénotypes semblent en apparence interreliés, ce sont en fait des propriétés partiellement dissociables génétiquement.

En soulignant l'importance d'une caractérisation rigoureuse des souches virales utilisées lors d'études comparatives, les expériences réalisées dans le cadre de ce mémoire pourraient également contribuer à l'amélioration du potentiel oncolytique du réovirus de mammifères via l'utilisation de mutants sensibles à l'IFN, potentiellement capables d'une meilleure discrimination entre cellules parentales et transformées.



## 10 Bibliographie

Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., and Flavell, R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* *413*, 732-738.

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

Azzam-Smoak, K., Noah, D.L., Stewart, M.J., Blum, M.A., and Sherry, B. (2002). Interferon regulatory factor-1, interferon-beta, and reovirus-induced myocarditis. *Virology* *298*, 20-29.

Baer, G.S., and Dermody, T.S. (1997). Mutations in reovirus outer-capsid protein sigma3 selected during persistent infections of L cells confer resistance to protease inhibitor E64. *J Virol* *71*, 4921-4928.

Barton, E.S., Forrest, J.C., Connolly, J.L., Chappell, J.D., Liu, Y., Schnell, F.J., Nusrat, A., Parkos, C.A., and Dermody, T.S. (2001). Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus. *Cell* *104*, 441-451.

Barton, E.S., Youree, B.E., Ebert, D.H., Forrest, J.C., Connolly, J.L., Valyi-Nagy, T., Washington, K., Wetzel, J.D., and Dermody, T.S. (2003). Utilization of sialic acid as a coreceptor is required for reovirus-induced biliary disease. *J Clin Invest* *111*, 1823-1833.

Becker, M.M., Peters, T.R., and Dermody, T.S. (2003). Reovirus sigma NS and mu NS proteins form cytoplasmic inclusion structures in the absence of viral infection. *J Virol* *77*, 5948-5963.

Bergeron, J., Mabrouk, T., Garzon, S., and Lemay, G. (1998). Characterization of the thermosensitive ts453 reovirus mutant: increased dsRNA binding of sigma 3 protein correlates with interferon resistance. *Virology* *246*, 199-210.

Beug, S.T., Pichette, S.J., St-Jean, M., Holbrook, J., Walker, D.E., LaCasse, E.C., and Korneluk, R.G. (2018). Combination of IAP Antagonists and TNF-alpha-Armed Oncolytic Viruses Induce Tumor Vascular Shutdown and Tumor Regression. *Mol Ther Oncolytics* *10*, 28-39.

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

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

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

Boehme, K.W., Frierson, J.M., Konopka, J.L., Kobayashi, T., and Dermody, T.S. (2011). The reovirus sigma1s protein is a determinant of hematogenous but not neural virus dissemination in mice. *J Virol* 85, 11781-11790.

Boehme, K.W., Guglielmi, K.M., and Dermody, T.S. (2009). Reovirus nonstructural protein sigma1s is required for establishment of viremia and systemic dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 19986-19991.

Boehme, K.W., Hammer, K., Tollefson, W.C., Konopka-Anstadt, J.L., Kobayashi, T., and Dermody, T.S. (2013). Nonstructural protein sigma1s mediates reovirus-induced cell cycle arrest and apoptosis. *J Virol* 87, 12967-12979.

Borsa, J., Sargent, M.D., Lievaart, P.A., and Copps, T.P. (1981). Reovirus: evidence for a second step in the intracellular uncoating and transcriptase activation process. *Virology* 111, 191-200.

Boudreault, S., Martenon-Brodeur, C., Caron, M., Garant, J.M., Tremblay, M.P., Armero, V.E., Durand, M., Lapointe, E., Thibault, P., Tremblay-Letourneau, M., *et al.* (2016). Global Profiling of the Cellular Alternative RNA Splicing Landscape during Virus-Host Interactions. *PLoS One* 11, e0161914.

Bouziat, R., Hinterleitner, R., Brown, J.J., Stencel-Baerenwald, J.E., Ikizler, M., Mayassi, T., Meisel, M., Kim, S.M., Discepolo, V., Pruijssers, A.J., *et al.* (2017). Reovirus infection triggers inflammatory responses to dietary antigens and development of celiac disease. *Science* 356, 44-50.

Boyce, M., Celma, C.C., and Roy, P. (2008). Development of reverse genetics systems for bluetongue virus: recovery of infectious virus from synthetic RNA transcripts. *J Virol* 82, 8339-8348.

Brentano, L., Noah, D.L., Brown, E.G., and Sherry, B. (1998). The reovirus protein mu2, encoded by the M1 gene, is an RNA-binding protein. *J Virol* 72, 8354-8357.

Bressy, C., Droby, G.N., Maldonado, B.D., Steuerwald, N., and Grdzlishvili, V.Z. (2018). Cell cycle arrest in G2/M phase enhances replication of interferon-sensitive cytoplasmic RNA viruses via inhibition of antiviral gene expression. *J Virol* 93 (4), e01885-18

Broering, T.J., Kim, J., Miller, C.L., Piggott, C.D., Dinoso, J.B., Nibert, M.L., and Parker, J.S. (2004). Reovirus nonstructural protein mu NS recruits viral core surface proteins and entering core particles to factory-like inclusions. *J Virol* 78, 1882-1892.

- Broering, T.J., Parker, J.S., Joyce, P.L., Kim, J., and Nibert, M.L. (2002). Mammalian reovirus nonstructural protein microNS forms large inclusions and colocalizes with reovirus microtubule-associated protein micro2 in transfected cells. *J Virol* 76, 8285-8297.
- Bujnicki, J.M., and Rychlewski, L. (2001). Reassignment of specificities of two cap methyltransferase domains in the reovirus lambda 2 protein. *Genome Biol* 2, research0038.1-0038.6.
- Chakrabarti, A., Jha, B.K., and Silverman, R.H. (2011). New insights into the role of RNase L in innate immunity. *J Interferon Cytokine Res* 31, 49-57.
- Chappell, J.D., Gunn, V.L., Wetzell, J.D., Baer, G.S., and Dermody, T.S. (1997). Mutations in type 3 reovirus that determine binding to sialic acid are contained in the fibrous tail domain of viral attachment protein sigma1. *J Virol* 71, 1834-1841.
- Chattopadhyay, S., and Sen, G.C. (2014). dsRNA-activation of TLR3 and RLR signaling: gene induction-dependent and independent effects. *J Interferon Cytokine Res* 34, 427-436.
- Chew, T., Noyce, R., Collins, S.E., Hancock, M.H., and Mossman, K.L. (2009). Characterization of the interferon regulatory factor 3-mediated antiviral response in a cell line deficient for IFN production. *Mol Immunol* 46, 393-399.
- Clemens, M.J., and Vaquero, C.M. (1978). Inhibition of protein synthesis by double-stranded RNA in reticulocyte lysates: evidence for activation of an endoribonuclease. *Biochem Biophys Res Commun* 83, 59-68.
- ClinicalTrials.gov. (2018a). Base de données en ligne. National Library of Medicine. Repéré à <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=reolysin&cntry1=&state1=&recrs=>
- ClinicalTrials.gov. (2014). Efficacy Study of REOLYSIN® in Combination With Paclitaxel and Carboplatin in Platinum-Refractory Head and Neck Cancers. Repéré à <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01166542>
- ClinicalTrials.gov. (2018b). A Study of Reolysin For Patients With Advanced/Metastatic Breast Cancer. Repéré à <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01656538>
- Coffey, M.C., Strong, J.E., Forsyth, P.A., and Lee, P.W. (1998). Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway. *Science* 282, 1332-1334.
- Committee on the Echo Viruses (1955). Enteric Cytopathogenic Human Orphan (ECHO) Viruses. *Science* 122, 1187-1188.
- Coombs, K.M. (2008). Reoviruses: Molecular Biology. In *Encyclopedia of Virology* (Third Edition), B.W.J. MahyMarc, and M.H.V. Van Regenmortel, eds. (Academic Press, Oxford), pp. 390-399.

- Daffis, S., Szretter, K.J., Schriewer, J., Li, J., Youn, S., Errett, J., Lin, T.Y., Schneller, S., Zust, R., Dong, H., *et al.* (2010). 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature* 468, 452-456.
- Dermody, T.S., Nibert, M.L., Wetzell, J.D., Tong, X., and Fields, B.N. (1993). Cells and viruses with mutations affecting viral entry are selected during persistent infections of L cells with mammalian reoviruses. *J Virol* 67, 2055-2063.
- Dermody, T.S., Parker, J.S.L., and Sherry, B. (2013). Chapter 44: Orthoreoviruses. In *Fields Virology* 6th ed. (Vol 2). (Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins).
- Doyle, J.D., Danthi, P., Kendall, E.A., Ooms, L.S., Wetzell, J.D., and Dermody, T.S. (2012). Molecular determinants of proteolytic disassembly of the reovirus outer capsid. *J Biol Chem* 287, 8029-8038.
- Drayna, D., and Fields, B.N. (1982). Activation and characterization of the reovirus transcriptase: genetic analysis. *J Virol* 41, 110-118.
- Eichwald, C., Kim, J., and Nibert, M.L. (2017). Dissection of mammalian orthoreovirus micro2 reveals a self-associative domain required for binding to microtubules but not to factory matrix protein microNS. *PLoS One* 12, e0184356.
- Emeny, J.M., and Morgan, M.J. (1979). Regulation of the interferon system: evidence that Vero cells have a genetic defect in interferon production. *J Gen Virol* 43, 247-252.
- Ernst, H., and Shatkin, A.J. (1985). Reovirus hemagglutinin mRNA codes for two polypeptides in overlapping reading frames. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 48-52.
- Ezzati, P., Komher, K., Severini, G., and Coombs, K.M. (2015). Comparative proteomic analyses demonstrate enhanced interferon and STAT-1 activation in reovirus T3D-infected HeLa cells. *Front Cell Infect Microbiol* 5, 30.
- Fan, J.B., Arimoto, K., Motamedchaboki, K., Yan, M., Wolf, D.A., and Zhang, D.E. (2015). Identification and characterization of a novel ISG15-ubiquitin mixed chain and its role in regulating protein homeostasis. *Sci Rep* 5, 12704.
- Fields, B.N., and Joklik, W.K. (1969). Isolation and preliminary genetic and biochemical characterization of temperature-sensitive mutants of reovirus. *Virology* 37, 335-342.
- Fountzilias, C., Patel, S., and Mahalingam, D. (2017). Review: Oncolytic virotherapy, updates and future directions. *Oncotarget* 8, 102617-102639.
- Fukuhara, H., Ino, Y., and Todo, T. (2016). Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn. *Cancer Sci* 107, 1373-1379.

- Garber, K. (2006). China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* *98*, 298-300.
- Golden, J.W., Linke, J., Schmechel, S., Thoemke, K., and Schiff, L.A. (2002). Addition of exogenous protease facilitates reovirus infection in many restrictive cells. *J Virol* *76*, 7430-7443.
- Gomatos, P.J., and Tamm, I. (1963). The Secondary Structure of Reovirus Rna. *Proc Natl Acad Sci U S A* *49*, 707-714.
- Goubau, D., Schlee, M., Deddouche, S., Pruijssers, A.J., Zillinger, T., Goldeck, M., Schubert, C., Van der Veen, A.G., Fujimura, T., Rehwinkel, J., *et al.* (2014). Antiviral immunity via RIG-I-mediated recognition of RNA bearing 5'-diphosphates. *Nature* *514*, 372-375.
- Gutwein, P., Schramme, A., Voss, B., Abdel-Bakky, M.S., Doberstein, K., Ludwig, A., Altevogt, P., Hansmann, M.L., Moch, H., Kristiansen, G., *et al.* (2009). Downregulation of junctional adhesion molecule-A is involved in the progression of clear cell renal cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* *380*, 387-391.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57-70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646-674.
- Harrison, S.J., Farsetta, D.L., Kim, J., Noble, S., Broering, T.J., and Nibert, M.L. (1999). Mammalian reovirus L3 gene sequences and evidence for a distinct amino-terminal region of the lambda1 protein. *Virology* *258*, 54-64.
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K.K., Schlee, M., *et al.* (2006). 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* *314*, 994-997.
- Hovanessian, A.G., and Justesen, J. (2007). The human 2'-5'oligoadenylate synthetase family: unique interferon-inducible enzymes catalyzing 2'-5' instead of 3'-5' phosphodiester bond formation. *Biochimie* *89*, 779-788.
- Howells, A., Marelli, G., Lemoine, N.R., and Wang, Y. (2017). Oncolytic Viruses-Interaction of Virus and Tumor Cells in the Battle to Eliminate Cancer. *Front Oncol* *7*, 195.
- Huismans, H., and Joklik, W.K. (1976). Reovirus-coded polypeptides in infected cells: isolation of two native monomeric polypeptides with affinity for single-stranded and double-stranded RNA, respectively. *Virology* *70*, 411-424.
- Ikegami, N., and Gomatos, P.J. (1968). Temperature-sensitive conditional-lethal mutants of reovirus 3. I. Isolation and characterization. *Virology* *36*, 447-458.

- Irvin, S.C., Zurney, J., Ooms, L.S., Chappell, J.D., Dermody, T.S., and Sherry, B. (2012). A single-amino-acid polymorphism in reovirus protein mu2 determines repression of interferon signaling and modulates myocarditis. *J Virol* *86*, 2302-2311.
- Jabre, R., Sandekian, V., and Lemay, G. (2013). Amino acid substitutions in sigma1 and mu1 outer capsid proteins are selected during mammalian reovirus adaptation to Vero cells. *Virus Res* *176*, 188-198.
- Jackson, G.G., and Muldoon, R.L. (1973). Viruses causing common respiratory infection in man. IV. Reoviruses and Adenoviruses. *J Infect Dis* *128*, 811-866.
- Jacobs, B.L., Atwater, J.A., Munemitsu, S.M., and Samuel, C.E. (1985). Biosynthesis of reovirus-specified polypeptides. The s1 mRNA synthesized in vivo is structurally and functionally indistinguishable from in vitro-synthesized s1 mRNA and encodes two polypeptides, sigma 1a and sigma 1bNS. *Virology* *147*, 9-18.
- Jansen van Vuren, P., Wiley, M., Palacios, G., Storm, N., McCulloch, S., Markotter, W., Birkhead, M., Kemp, A., and Paweska, J.T. (2016). Isolation of a Novel Fusogenic Orthoreovirus from *Eucampsipoda africana* Bat Flies in South Africa. *Viruses* *8*, 65.
- Kanai, Y., Komoto, S., Kawagishi, T., Nouda, R., Nagasawa, N., Onishi, M., Matsuura, Y., Taniguchi, K., and Kobayashi, T. (2017). Entirely plasmid-based reverse genetics system for rotaviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* *114*, 2349-2354.
- Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, T.S., Fujita, T., and Akira, S. (2008). Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med* *205*, 1601-1610.
- Kawagishi, T., Kanai, Y., Tani, H., Shimojima, M., Saijo, M., Matsuura, Y., and Kobayashi, T. (2016). Reverse Genetics for Fusogenic Bat-Borne Orthoreovirus Associated with Acute Respiratory Tract Infections in Humans: Role of Outer Capsid Protein sigmaC in Viral Replication and Pathogenesis. *PLoS Pathog* *12*, e1005455.
- Kerr, I.M., Brown, R.E., and Hovanessian, A.G. (1977). Nature of inhibitor of cell-free protein synthesis formed in response to interferon and double-stranded RNA. *Nature* *268*, 540-542.
- Kibenge, M.J., Iwamoto, T., Wang, Y., Morton, A., Godoy, M.G., and Kibenge, F.S. (2013). Whole-genome analysis of piscine reovirus (PRV) shows PRV represents a new genus in family Reoviridae and its genome segment S1 sequences group it into two separate sub-genotypes. *Virol J* *10*, 230.
- King, A., Adams, M.J., Carstens, E.B., and Lefkowitz, E.J. (2011). Family-Reoviridae. In *Virus Taxonomy*, 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, (Elsevier), pp. 541-637.

Knowlton, J.J., Dermody, T.S., and Holm, G.H. (2012). Apoptosis induced by mammalian reovirus is beta interferon (IFN) independent and enhanced by IFN regulatory factor 3- and NF-kappaB-dependent expression of Noxa. *J Virol* 86, 1650-1660.

Kobayashi, T., Antar, A.A., Boehme, K.W., Danthi, P., Eby, E.A., Guglielmi, K.M., Holm, G.H., Johnson, E.M., Maginnis, M.S., Naik, S., *et al.* (2007). A plasmid-based reverse genetics system for animal double-stranded RNA viruses. *Cell Host Microbe* 1, 147-157.

Kobayashi, T., Ooms, L.S., Ikizler, M., Chappell, J.D., and Dermody, T.S. (2010). An improved reverse genetics system for mammalian orthoreoviruses. *Virology* 398, 194-200.

Komoto, S., Kawagishi, T., Kobayashi, T., Ikizler, M., Iskarpatyoti, J., Dermody, T.S., and Taniguchi, K. (2014). A plasmid-based reverse genetics system for mammalian orthoreoviruses driven by a plasmid-encoded T7 RNA polymerase. *J Virol Methods* 196, 36-39.

Konopka-Anstadt, J.L., Mainou, B.A., Sutherland, D.M., Sekine, Y., Strittmatter, S.M., and Dermody, T.S. (2014). The Nogo receptor NgR1 mediates infection by mammalian reovirus. *Cell Host Microbe* 15, 681-691.

Lemaire, P.A., Anderson, E., Lary, J., and Cole, J.L. (2008). Mechanism of PKR Activation by dsRNA. *J Mol Biol* 381, 351-360.

Lemay, G. (2011). La génétique inverse dans l'étude des réovirus : progrès, obstacles et développements futurs. *Virologie* 15, 53-62

Lemay, G. (2016). Les réovirus (Orthoreovirus): Réplication et activité oncolytique. MCB 6045 Virologie fondamentale. Notes de cours (présentation PowerPoint). Repéré dans l'environnement StudiUM: <https://studium.umontreal.ca>

Lemay, G. (2018). Synthesis and Translation of Viral mRNA in Reovirus-Infected Cells: Progress and Remaining Questions. *Viruses* 10.

Lemay, G., and Danis, C. (1994). Reovirus lambda 1 protein: affinity for double-stranded nucleic acids by a small amino-terminal region of the protein independent from the zinc finger motif. *J Gen Virol* 75 (*Pt 11*), 3261-3266.

Li, Y., Banerjee, S., Wang, Y., Goldstein, S.A., Dong, B., Gaughan, C., Silverman, R.H., and Weiss, S.R. (2016). Activation of RNase L is dependent on OAS3 expression during infection with diverse human viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 2241-2246.

Liemann, S., Chandran, K., Baker, T.S., Nibert, M.L., and Harrison, S.C. (2002). Structure of the reovirus membrane-penetration protein, Mu1, in a complex with its protector protein, Sigma3. *Cell* 108, 283-295.

Loeb, K.R., and Haas, A.L. (1992). The interferon-inducible 15-kDa ubiquitin homolog conjugates to intracellular proteins. *J Biol Chem* 267, 7806-7813.

Loo, Y.M., Fornek, J., Crochet, N., Bajwa, G., Perwitasari, O., Martinez-Sobrido, L., Akira, S., Gill, M.A., Garcia-Sastre, A., Katze, M.G., *et al.* (2008). Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *J Virol* 82, 335-345.

Luongo, C.L., Reinisch, K.M., Harrison, S.C., and Nibert, M.L. (2000). Identification of the guanylyltransferase region and active site in reovirus mRNA capping protein lambda2. *J Biol Chem* 275, 2804-2810.

Mabrouk, T., Danis, C., and Lemay, G. (1995). Two basic motifs of reovirus sigma 3 protein are involved in double-stranded RNA binding. *Biochem Cell Biol* 73, 137-145.

Maginnis, M.S., Forrest, J.C., Kopecky-Bromberg, S.A., Dickeson, S.K., Santoro, S.A., Zutter, M.M., Nemerow, G.R., Bergelson, J.M., and Dermody, T.S. (2006). Beta1 integrin mediates internalization of mammalian reovirus. *J Virol* 80, 2760-2770.

Malathi, K., Dong, B., Gale, M., Jr., and Silverman, R.H. (2007). Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature* 448, 816-819.

Malumbres, M., and Barbacid, M. (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 3, 459-465.

Malumbres, M., and Pellicer, A. (1998). RAS pathways to cell cycle control and cell transformation. *Front Biosci* 3, d887-912.

Marcato, P., Shmulevitz, M., Pan, D., Stoltz, D., and Lee, P.W. (2007). Ras transformation mediates reovirus oncolysis by enhancing virus uncoating, particle infectivity, and apoptosis-dependent release. *Mol Ther* 15, 1522-1530.

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

Minuk, G.Y., Paul, R.W., and Lee, P.W. (1985). The prevalence of antibodies to reovirus type 3 in adults with idiopathic cholestatic liver disease. *J Med Virol* 16, 55-60.

Mohamed, A., Johnston, R.N., and Shmulevitz, M. (2015). Potential for Improving Potency and Specificity of Reovirus Oncolysis with Next-Generation Reovirus Variants. *Viruses* 7, 6251-6278.

Mundschau, L.J., and Faller, D.V. (1992). Oncogenic ras induces an inhibitor of double-stranded RNA-dependent eukaryotic initiation factor 2 alpha-kinase activation. *J Biol Chem* 267, 23092-23098.

Mundschau, L.J., and Faller, D.V. (1994). Endogenous inhibitors of the dsRNA-dependent eIF-2 alpha protein kinase PKR in normal and ras-transformed cells. *Biochimie* 76, 792-800.



Naik, M.U., Naik, T.U., Suckow, A.T., Duncan, M.K., and Naik, U.P. (2008). Attenuation of junctional adhesion molecule-A is a contributing factor for breast cancer cell invasion. *Cancer Res* 68, 2194-2203.

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

Nibert, M. L., Schiff, L. A., and Fields, B. N. (1996). Reoviruses and their replication. In “Fields Virology” (B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley, Eds.), 3rd ed., pp. 1557–1596. Lippincott–Raven, Philadelphia.

Nilsen, T.W., Maroney, P.A., and Baglioni, C. (1982). Synthesis of (2'-5')oligoadenylate and activation of an endoribonuclease in interferon-treated HeLa cells infected with reovirus. *J Virol* 42, 1039-1045.

Noble, S., and Nibert, M.L. (1997a). Characterization of an ATPase activity in reovirus cores and its genetic association with core-shell protein lambda1. *J Virol* 71, 2182-2191.

Noble, S., and Nibert, M.L. (1997b). Core protein mu2 is a second determinant of nucleoside triphosphatase activities by reovirus cores. *J Virol* 71, 7728-7735.

Odendall, C., and Kagan, J.C. (2017). Activation and pathogenic manipulation of the sensors of the innate immune system. *Microbes Infect* 19, 229-237.

Okumura, A., Pitha, P.M., and Harty, R.N. (2008). ISG15 inhibits Ebola VP40 VLP budding in an L-domain-dependent manner by blocking Nedd4 ligase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3974-3979.

Oncolytics Biotech Inc. (2018). Studies : Development Plan. Repéré à <https://www.oncolyticsbiotech.com/clinical-trials/studies>

Ooms, L.S., Jerome, W.G., Dermody, T.S., and Chappell, J.D. (2012). Reovirus replication protein mu2 influences cell tropism by promoting particle assembly within viral inclusions. *J Virol* 86, 10979-10987.

Palacios, G., Lovoll, M., Tengs, T., Hornig, M., Hutchison, S., Hui, J., Kongtorp, R.T., Savji, N., Bussetti, A.V., Solovyov, A., *et al.* (2010). Heart and skeletal muscle inflammation of farmed salmon is associated with infection with a novel reovirus. *PLoS One* 5, e11487.

Parker, J.S., Broering, T.J., Kim, J., Higgins, D.E., and Nibert, M.L. (2002). Reovirus core protein mu2 determines the filamentous morphology of viral inclusion bodies by interacting with and stabilizing microtubules. *J Virol* 76, 4483-4496.

Patrick, M., Duncan, R., and Coombs, K.M. (2001). Generation and genetic characterization of avian reovirus temperature-sensitive mutants. *Virology* 284, 113-122.

Pfeffer, L.M. (2011). The role of nuclear factor kappaB in the interferon response. *J Interferon Cytokine Res* 31, 553-559.

Phillips, M.B., Stuart, J.D., Rodriguez Stewart, R.M., Berry, J.T., Mainou, B.A., and Boehme, K.W. (2018a). Current understanding of reovirus oncolysis mechanisms. *Oncolytic Virother* 7, 53-63.

Phillips, M.B., Stuart, J.D., Simon, E.J., and Boehme, K.W. (2018b). Non-structural protein sigma1s is required for optimal reovirus protein expression. *J Virol*.

Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C.P., Naslund, T.I., Liljestrom, P., Weber, F., and Reis e Sousa, C. (2006). RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 314, 997-1001.

Plumet, S., Herschke, F., Bourhis, J.M., Valentin, H., Longhi, S., and Gerlier, D. (2007). Cytosolic 5'-triphosphate ended viral leader transcript of measles virus as activator of the RIG I-mediated interferon response. *PLoS One* 2, e279.

Poggioli, G.J., Keefer, C., Connolly, J.L., Dermody, T.S., and Tyler, K.L. (2000). Reovirus-induced G(2)/M cell cycle arrest requires sigma1s and occurs in the absence of apoptosis. *J Virol* 74, 9562-9570.

Pol, J., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2016). First oncolytic virus approved for melanoma immunotherapy. *Oncoimmunology* 5, e1115641.

Pol, J., Resseguier, J., and Lichty, B. (2011). Oncolytic viruses: a step into cancer immunotherapy. *Virus Adapt. Treat.* 2012, 1–21.

Prior, I.A., Lewis, P.D., and Mattos, C. (2012). A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res* 72, 2457-2467.

Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E., and Bar-Sagi, D. (2011). RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer* 11, 761-774.

Radcliffe Department of Medicine (University of Oxford). (2018). Rehwinkel Group : Nucleic Acid Sensing. Repéré à <https://www.rdm.ox.ac.uk/about/our-divisions/investigative-medicine-division/investigative-medicine-division-research/nucleic-acid-sensing>

Rivera-Serrano, E.E., Fritch, E.J., Scholl, E.H., and Sherry, B. (2017). A Cytoplasmic RNA Virus Alters the Function of the Cell Splicing Protein SRSF2. *J Virol* 91.

- Rodgers, S.E., Connolly, J.L., Chappell, J.D., and Dermody, T.S. (1998). Reovirus growth in cell culture does not require the full complement of viral proteins: identification of a sigma1s-null mutant. *J Virol* 72, 8597-8604.
- Roner, M.R., and Joklik, W.K. (2001). Reovirus reverse genetics: Incorporation of the CAT gene into the reovirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8036-8041.
- Roner, M.R., Sutphin, L.A., and Joklik, W.K. (1990). Reovirus RNA is infectious. *Virology* 179, 845-852.
- Rosen, L., Evans, H.E., and Spickard, A. (1963). Reovirus infections in human volunteers. *Am J Hyg* 77, 29-37.
- Rudd, P., and Lemay, G. (2005). Correlation between interferon sensitivity of reovirus isolates and ability to discriminate between normal and Ras-transformed cells. *J Gen Virol* 86, 1489-1497.
- Russell, S.J., Peng, K.W., and Bell, J.C. (2012). Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol* 30, 658-670.
- Sabin, A.B. (1959). Reoviruses. A new group of respiratory and enteric viruses formerly classified as ECHO type 10 is described. *Science* 130, 1387-1389.
- Samuel, C.E. (1998). Reoviruses and the interferon system. *Curr Top Microbiol Immunol* 233, 125-145.
- Sandekian, V., and Lemay, G. (2015a). Amino acids substitutions in sigma1 and mu1 outer capsid proteins of a Vero cell-adapted mammalian orthoreovirus are required for optimal virus binding and disassembly. *Virus Res* 196, 20-29.
- Sandekian, V., and Lemay, G. (2015b). A single amino acid substitution in the mRNA capping enzyme lambda2 of a mammalian orthoreovirus mutant increases interferon sensitivity. *Virology* 483, 229-235.
- Sandekian, V., Lim, D., Prud'homme, P., and Lemay, G. (2013). Transient high level mammalian reovirus replication in a bat epithelial cell line occurs without cytopathic effect. *Virus Res* 173, 327-335.
- Schiff, L. A., Nibert, M. L., & Tyler, K. L. (2007). Orthoreoviruses and their replication. In D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman & S. E. Straus (Eds.), *Fields virology* (5 ed., pp. 1853-1915). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Schittone, S.A., Dionne, K.R., Tyler, K.L., and Clarke, P. (2012). Activation of innate immune responses in the central nervous system during reovirus myelitis. *J Virol* 86, 8107-8118.

Shah, P.N.M., Stanifer, M.L., Hohn, K., Engel, U., Haselmann, U., Bartenschlager, R., Krausslich, H.G., Krijnse-Locker, J., and Boulant, S. (2017). Genome packaging of reovirus is mediated by the scaffolding property of the microtubule network. *Cell Microbiol* 19.

Sherry, B. (2009). Rotavirus and reovirus modulation of the interferon response. *J Interferon Cytokine Res* 29, 559-567.

Sherry, B., Torres, J., and Blum, M.A. (1998). Reovirus induction of and sensitivity to beta interferon in cardiac myocyte cultures correlate with induction of myocarditis and are determined by viral core proteins. *J Virol* 72, 1314-1323.

Shmulevitz, M., Pan, L.Z., Garant, K., Pan, D., and Lee, P.W. (2010). Oncogenic Ras promotes reovirus spread by suppressing IFN-beta production through negative regulation of RIG-I signaling. *Cancer Res* 70, 4912-4921.

Sinkovics, J.G., and Horvath, J.C. (2008). Natural and genetically engineered viral agents for oncolysis and gene therapy of human cancers. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 56 Suppl 1, 3s-59s.

Smith, J.A., Schmechel, S.C., Williams, B.R., Silverman, R.H., and Schiff, L.A. (2005). Involvement of the interferon-regulated antiviral proteins PKR and RNase L in reovirus-induced shutoff of cellular translation. *J Virol* 79, 2240-2250.

Stanifer, M.L., Kischnick, C., Rippert, A., Albrecht, D., and Boulant, S. (2017). Reovirus inhibits interferon production by sequestering IRF3 into viral factories. *Sci Rep* 7, 10873.

Stojdl, D.F., Lichty, B., Knowles, S., Marius, R., Atkins, H., Sonenberg, N., and Bell, J.C. (2000). Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat Med* 6, 821-825.

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

Sze, D.Y., Reid, T.R., and Rose, S.C. (2013). Oncolytic virotherapy. *J Vasc Interv Radiol* 24, 1115-1122.

Tai, J.H., Williams, J.V., Edwards, K.M., Wright, P.F., Crowe, J.E., Jr., and Dermody, T.S. (2005). Prevalence of reovirus-specific antibodies in young children in Nashville, Tennessee. *J Infect Dis* 191, 1221-1224.

Takeuchi, O., and Akira, S. (2009). Innate immunity to virus infection. *Immunol Rev* 227, 75-86.

Takeuchi, T., and Yokosawa, H. (2005). ISG15 modification of Ubc13 suppresses its ubiquitin-conjugating activity. *Biochem Biophys Res Commun* 336, 9-13.

Thalmann, C.M., Cummins, D.M., Yu, M., Lunt, R., Pritchard, L.I., Hansson, E., Cramer, S., Hyatt, A., and Wang, L.F. (2010). Broome virus, a new fusogenic Orthoreovirus species isolated from an Australian fruit bat. *Virology* 402, 26-40.

Thompson, M.R., Kaminski, J.J., Kurt-Jones, E.A., and Fitzgerald, K.A. (2011). Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses* 3, 920-940.

Tian, J., Zhang, X., Wu, H., Liu, C., Li, Z., Hu, X., Su, S., Wang, L.F., and Qu, L. (2015). Blocking the PI3K/AKT pathway enhances mammalian reovirus replication by repressing IFN-stimulated genes. *Front Microbiol* 6, 886.

Toth, A.M., Zhang, P., Das, S., George, C.X., and Samuel, C.E. (2006). Interferon action and the double-stranded RNA-dependent enzymes ADAR1 adenosine deaminase and PKR protein kinase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 81, 369-434.

Tyler, K.L., Barton, E.S., Ibach, M.L., Robinson, C., Campbell, J.A., O'Donnell, S.M., Valyi-Nagy, T., Clarke, P., Wetzel, J.D., and Dermody, T.S. (2004). Isolation and molecular characterization of a novel type 3 reovirus from a child with meningitis. *J Infect Dis* 189, 1664-1675.

ViralZone (2013). Orthoreovirus. In ViralZone. Repéré à [https://viralzone.expasy.org/105?outline=all\\_by\\_species](https://viralzone.expasy.org/105?outline=all_by_species)

Wetzel, J.D., Wilson, G.J., Baer, G.S., Dunnigan, L.R., Wright, J.P., Tang, D.S., and Dermody, T.S. (1997). Reovirus variants selected during persistent infections of L cells contain mutations in the viral S1 and S4 genes and are altered in viral disassembly. *J Virol* 71, 1362-1369.

Wiener, J.R., Bartlett, J.A., and Joklik, W.K. (1989). The sequences of reovirus serotype 3 genome segments M1 and M3 encoding the minor protein mu 2 and the major nonstructural protein mu NS, respectively. *Virology* 169, 293-304.

Wiley, J.S., Sluyter, R., Gu, B.J., Stokes, L., and Fuller, S.J. (2011). The human P2X7 receptor and its role in innate immunity. *Tissue Antigens* 78, 321-332.

Wu, A.G., Pruijssers, A.J., Brown, J.J., Stencel-Baerenwald, J.E., Sutherland, D.M., Iskarpatyoti, J.A., and Dermody, T.S. (2018). Age-dependent susceptibility to reovirus encephalitis in mice is influenced by maturation of the type-I interferon response. *Pediatr Res* 83, 1057-1066.

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

Zhang, C., He, H., Wang, L., Zhang, N., Huang, H., Xiong, Q., Yan, Y., Wu, N., Ren, H., Han, H., *et al.* (2017). Virus-Triggered ATP Release Limits Viral Replication through Facilitating IFN-beta Production in a P2X7-Dependent Manner. *J Immunol* 199, 1372-1381.

Zurney, J., Kobayashi, T., Holm, G.H., Dermody, T.S., and Sherry, B. (2009). Reovirus mu2 protein inhibits interferon signaling through a novel mechanism involving nuclear accumulation of interferon regulatory factor 9. *J Virol* 83, 2178-2187.

Zust, R., Cervantes-Barragan, L., Habjan, M., Maier, R., Neuman, B.W., Ziebuhr, J., Szretter, K.J., Baker, S.C., Barchet, W., Diamond, M.S., *et al.* (2011). Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5. *Nat Immunol* 12, 137-143.

# 11 Annexe

## 11.1 Autres contributions

### 11.1.1 Présentations orales

*Étude des déterminants de l'induction et de la sensibilité à l'interféron chez le réovirus de mammifères*

- Journée de la Recherche, Département de microbiologie, immunologie et infectiologie, UdeM (2017)
- Congrès ACFAS, Université McGill (2017)

### 11.1.2 Affiches présentées à l'occasion de congrès internationaux

Boudreault, S., Côté, S., **Lanoie, D.**, Durand, M., Lapointe, E., Thibault, P., Sandekian, V., Bisailon, M. et Lemay, G. *Combination of classical genetics, reverse genetics and transcriptomics to study reovirus' interferon sensitivity and host cell response*. 3rd Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society, Bamberg, Allemagne (2015)

**Lanoie, D.**, Degeorges, E., Côté, S., Sandekian, V. et Lemay, G. *Combining classical and reverse genetics to study the multiple proteins of mammalian orthoreoviruses affecting induction of and sensitivity to the interferon response*. 13th International dsRNA Virus Symposium, Houffalize, Belgique (2018)