

Université de Montréal

**Combinaison d'approches classiques et de génétique
inverse en vue d'une meilleure compréhension du
tropisme et de l'activité oncolytique du réovirus de
mammifères**

par

Véronique Sandekian

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Ph.D
en Virologie et Immunologie

18 Décembre 2014

© Véronique Sandekian, 2014

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Combinaison d'approches classiques et de génétique
inverse en vue d'une meilleure compréhension du tropisme et de l'activité oncolytique du
réovirus de mammifères

Présenté par :
Véronique Sandekian

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Hugo Soudeyns, président-rapporteur

Dr Guy Lemay, directeur de recherche

Dr Roger Lippé, membre du jury

Dr Tommy Alain, examinateur externe

Dre Carolina Alfieri, représentante du doyen de la FESP

Résumé

Le réovirus de mammifères se multiplie et détruit préférentiellement les cellules cancéreuses. Il est d'ailleurs actuellement à l'étude pour traiter divers types de cancers chez l'humain. L'objectif de cette étude était de mieux comprendre les diverses composantes impliquées dans le cycle viral de réovirus qui pourraient potentiellement être importantes dans le contexte d'optimisation de son potentiel oncolytique, ceci en utilisant une combinaison d'approches classiques ainsi que de génétique inverse.

L'approche par persistance virale est classiquement utilisée pour identifier de nouveaux mutants de réovirus. Celle-ci a surtout mené à la sélection de mutants de décapsulation chez les cellules L929. Ici, des virus adaptés furent récupérés de cellules Vero (VeroAV) et contrairement aux autres mutants de persistance, ce virus possède des substitutions d'acides aminés sur les protéines mu1 et sigma1. L'approche par génétique inverse a permis de démontrer que la fixation de VeroAV sur les acides sialiques des cellules Vero était favorisée. Les substitutions sur sigma1 seraient principalement responsables de ce phénotype quoique le contexte de la substitution de mu1 puisse affecter l'infectivité du virus.

Dans un deuxième volet, il a été remarqué que le virus de type sauvage utilisé pour la génétique inverse (T3D^K) était plus sensible à l'interféron comparativement au virus de type sauvage de notre laboratoire (T3D^S). Après séquençage complet du virus T3D^S nous avons reconstruit, par génétique inverse, le virus T3D^S. Nous avons donc pu poursuivre nos études sur le virus P4L-12 précédemment isolé au laboratoire par mutagenèse chimique. Il a été préalablement démontré que P4L-12 possède une meilleure réplication chez les cellules transformées et un blocage plus complet chez les cellules parentales, phénotype relié à une sensibilité accrue à l'interféron. Dans cette étude, des substitutions d'acides aminés sur les protéines sigma3, mu1, muNS et lambda2 furent identifiés. Nous avons démontré, par génétique inverse, que la substitution sur la protéine lambda2 était principalement responsable du phénotype de sensibilité à l'interféron.

Ces approches de persistance ou de sélection de mutants sensibles à l'interféron, suivies d'une caractérisation par génétique inverse seront certainement utiles à une meilleure compréhension de réovirus et pourraient contribuer à améliorer son potentiel oncolytique.

Mots-clés : Réovirus, Génétique inverse, Persistance virale, Interféron, Fixation, Décapsidation, Oncolyse virale

Abstract

The mammalian reovirus preferentially replicates and kills cancer cells. It is therefore currently used in clinical trials to treat various types of cancers in humans. The main objective of this study was to get a better understanding of the various components involved in the reovirus replication cycle that could potentially be important for the optimization of its oncolytic properties using a combination of traditional approaches and the newly described reverse genetics technique.

Classically, the viral persistence approach is undertaken to identify new reovirus variants. This has led to the selection of uncoating mutants in L929 cells. In this study, adapted viruses were recovered from Vero cells (VeroAV) and unlike other persistence mutants, VeroAV had amino acid substitutions on the mu1 and the sigma1 proteins. The reverse genetics approach demonstrated that VeroAV had a better binding ability onto sialic acids of Vero cells. Substitutions on sigma1 were found to be mainly responsible for this phenotype although mu1 substitutions may affect virus infectivity.

In a second study, we noticed that the reverse genetics wild-type virus (T3D^K) was more sensitive to interferon when compared with the wild-type virus from our laboratory (T3D^S). After complete sequencing of the T3D^S, we then constructed a T3D^S by reverse genetics. This allowed us to proceed in our studies of a mutant virus previously recovered in our laboratory by chemical mutagenesis (P4L-12). It was previously established that P4L-12 had an enhanced replication in transformed cells while sparing the parental cells and this phenotype was correlated to an increased sensitivity to interferon. In this study, amino acid substitutions on the sigma3, mu1, muNS and lambda2 proteins were identified. By using the reverse genetics approach, we demonstrated that the substitution found on the lambda2 protein was primarily responsible for the increase in sensitivity to interferon of P4L-12.

The combination of approaches based on persistence or selection of mutants sensitive to interferon followed by characterization with reverse genetics will certainly be useful to get a better understanding of reovirus in order to improve its oncolytic capacity.

Keywords: Reovirus, Reverse Genetics, Viral persistence, Interferon, Binding, Uncoating, Viral oncolysis

Table des matières

1	Caractéristiques générales de Réovirus	1
1.1	Classification	1
1.1.1	Capacité fusogénique des différentes espèces	1
1.2	Découverte de réovirus et de ses sérotypes majeurs.....	2
1.2.1	Symptômes associés et nouveaux cas cliniques	3
1.3	Structure générale du virus	5
1.4	Cycle de réplication	9
1.5	Protéines importantes au projet et leurs fonctions.....	11
1.5.1	Sigma1	12
1.5.2	Sigma3	18
1.5.3	Mu1	21
1.5.4	Lambda2	25
2	L'activité oncolytique	27
2.1	Généralités sur les cancers et les virus oncolytiques	27
2.2	Types de virus oncolytiques	28
2.2.1	Le virus de l'herpès simplex	29
2.2.2	Le virus de la vaccine	30
2.2.3	Le virus de la stomatite vésiculaire.....	31
2.2.4	L'adénovirus	32
2.3	Obstacles à l'utilisation des virus oncolytiques.....	33
2.3.1	Inquiétudes au niveau de la sécurité et de l'éthique	33
2.4	Nouvelles stratégies prometteuses	34
2.5	Le cas de réovirus	36
2.5.1	L'oncogène Ras et son importance dans l'infection par réovirus.....	37
2.5.2	L'interféron.....	39
2.5.3	La décapsidation de réovirus chez les cellules cancéreuses	43
2.5.4	Mécanismes de mort cellulaire induite par réovirus	44
2.5.5	Autres composantes importantes pour l'oncolyse de réovirus	47
2.6	Essais cliniques avec Reolysin®	47

2.6.1	Limites possibles.....	48
2.6.2	Autres stratégies.....	49
3	Approches pour modifier génétiquement réovirus	52
3.1	La mutagenèse chimique.....	52
3.2	La persistance virale	52
3.2.1	Quelques cas de mutants de persistance	54
3.3	Autres mutants historiquement pertinents	56
3.4	La génétique inverse d’hier à aujourd’hui	56
3.4.1	Les débuts de la génétique inverse.....	56
3.4.2	La génétique inverse d’aujourd’hui	58
4	Problématiques et objectifs du projet.....	63
4.1	L’adaptation de réovirus sur des cellules Vero.....	64
4.2	Étude de la sensibilité à l’interféron du virus P4L-12	65
5	Résultats.....	66
5.1	Adaptation de réovirus sur les cellules Vero.	66
5.1.1	Research highlights.....	67
5.1.2	Abstract.....	69
5.1.3	Introduction (Section 1).....	69
5.1.4	Materials and methods (Section 2)	72
5.1.5	Results (Section 3)	77
5.1.6	Discussion (Section 4)	84
5.1.7	Acknowledgments.....	89
5.1.8	References.....	90
5.1.9	Tables and figures.....	103
5.2	Caractérisation par génétique inverse de VeroAV.....	112
5.2.1	Research highlights.....	113
5.2.2	Abstract.....	115
5.2.3	Introduction (Section 1).....	116
5.2.4	Materials and methods (Section 2)	118
5.2.5	Results (Section 3).....	122
5.2.6	Discussion (Section 4)	129

5.2.7	Acknowledgments	133
5.2.8	References.....	134
5.2.9	Tables and figures.....	142
5.2.10	Supplementary figure.....	151
5.3	Une substitution d'un acide aminé sur l'enzyme lambda2 est responsable d'une sensibilité accrue à l'interféron.....	152
5.3.1	Research highlights.....	153
5.3.2	Abstract.....	155
5.3.3	Introduction.....	156
5.3.4	Results.....	157
5.3.5	Discussion.....	162
5.3.6	Materials and methods.....	165
5.3.7	Acknowledgments	167
5.3.8	References.....	168
5.3.9	Figure legends.....	174
6	Discussion et perspectives	179
6.1	Résumé et discussion des différents projets	179
6.1.1	L'adaptation de réovirus sur les cellules Vero.....	179
6.1.2	La caractérisation du VeroAV.....	180
6.1.3	Étude d'un mutant de réovirus et de sa sensibilité à l'interféron.....	183
6.2	Avenues connexes intéressantes	185
6.2.1	L'aspect décapsidation de P4L12	185
6.2.2	Le potentiel de discrimination de P4L-12 entre les cellules NIH parentales et transformées.....	190
6.2.3	Sensibilité à l'IFN de différents virus.....	195
6.2.4	La notion de « type sauvage »	196
6.2.5	Précautions à prendre lors de l'utilisation de la génétique inverse.....	197
7	Conclusion	198

Liste des tableaux

Tableau I : Liste des gènes de réovirus ainsi que leurs fonctions associées.	7
Tableau II : (Table 1). Amino acids substitutions in the three outer capsid proteins observed in viruses obtained from different persistently-infected cell lines.	103
Tableau III : (Table 2). Amino acids substitutions in the $\mu 1$ protein of Vero-AV and ten independent clones obtained from PCR-amplified fragment.....	104
Tableau IV : (Table 1). Amino acids substitutions in outer capsid proteins of VeroAV.	142
Tableau V : (Table 2). Plaque size of rescued viruses.....	143
Tableau VI : (Table 1). Amino acids differences between wild-type reovirus type 3 Dearing laboratory stock (T3D ^S) and derived mutant P4L-12.	174
Tableau VII : (Table 2). Amino acids differences between different reovirus type 3 Dearing.....	175

Liste des figures

Fig. 1. Les différentes formes de réovirus.....	8
Fig. 2. Cycle de réplication de réovirus.....	11
Fig. 3. Protéine sigma1 cristallisée en complexe avec différentes formes d'acides sialiques et résidus impliqués dans ces interactions.....	14
Fig. 4. Hétérohexamère de sigma 3 et mu1.....	19
Fig. 5. Changements conformationnels sur les protéines de la capsid externe, sigma3 et mu1 lors de la décapsidation et l'entrée.....	23
Fig. 6. Ras et ses voies de signalisation et leurs implications au niveau cellulaire.....	38
Fig. 7. Exemple de voies de signalisation de l'IFN stimulées suite à une infection virale et protéines cellulaires impliquées.....	40
Fig. 8. Voies de signalisation impliquant Ras, PKR et l'interféron (IFN β) suite à une infection par réovirus.....	42
Fig. 9. Les composantes de réplication de réovirus qui sont favorisées dans les cellules transformées par l'oncogène Ras.....	46
Fig. 10. La persistance cellulaire chez réovirus.....	53
Fig. 11. Le système de génétique inverse établi à partir des segments de réovirus clonés sur des plasmides.....	60
Figures de l'article 1	103
Fig. 1. Plaque formation by VeroAV.....	105
Fig. 2. Efficiency of infection by VeroAV determined by FACS analysis.....	106
Fig. 3. Synthesis of viral protein in VeroAV-infected cells.....	107
Fig. 4. Production of infectious virus in VeroAV-infected cells.....	108
Fig. 5. Sensitivity of VeroAV to lysosomal protease inhibitor.....	109
Fig. 6. Sensitivity of VeroAV to interferon.....	110
Fig. 7. Positions of amino acids substitutions on μ 1 structure.....	111
Figures de l'article 2	142
Fig. 1. Virus binding at the cell surface.....	144
Fig. 2. Effect of sialic acid removal on virus binding.....	145

Fig. 3. <i>In vitro</i> proteolytic cleavage of outer capsid proteins.	146
Fig. 4. Replicative ability of rescued viruses.	147
Fig. 5. Infection of Vero cells with rescued viruses.	148
Fig. 6. Phenotypic properties of rescued T3D ^K (σ 1-AV/ μ 1-AV).	149
Fig. 7. Amount of σ 1 in virions of rescued viruses.	150
Fig. S1. Hemagglutination potential of VeroAV compared to the T3DS.	151
Figures de l'article 3	174
Fig. 1. Infectivity and replication of the different rescued viruses.	176
Fig. 2. Interferon sensitivity of the different rescued viruses.	177
Fig. 3. Effect of different doses of interferon on the rescued viruses.	178
Figures de la discussion	186
Fig. 1. Infections à une M.I. de 0.5 UFP/cellule des différents mutants de P4L-12 sur des cellules Vero en présence ou en absence de chymotrypsine (5 μ g/ml).	187
Fig. 2. Sensibilité de P4L-12 à un inhibiteur de protéases (E-64).	188
Fig. 3. Positions des différentes substitutions d'acides aminés de P4L-12 comparé au T3D ^S (M221I et G198E sur sigma3 et P315S sur mu1) par rapport à d'autres substitutions connues.	190
Fig. 4. Images de différentes cellules parentales et transformées par l'oncogène Ras établies au laboratoire.	192
Fig. 5. Immunobuvardage sur différentes lignées de cellules parentales et transformées par l'oncogène Ras infectées par des virus de type sauvage ou le virus mutant P4L-12.	194
Figures de l'article 4	xxx
Fig. 1. Tb1.Lu cells are resistant to reovirus-induced cell lysis.	xxxix
Fig. 2. Reovirus replication kinetics in Tb1.Lu cells.	xxxix
Fig. 3. Percentage of Tb1.Lu infected cells by reovirus T3D measured by FACS analysis.	xxxix
Fig. 4. Infection of Tb1.Lu cells by virions or ISVPs.	xxxix
Fig. 5. Secretion of an antiviral factor by reovirus-infected Tb1.Lu cells.	xxxix
Fig. 6. Cell transformation status of control and Ras-transduced Tb1.Lu cells.	xxxix
Fig. 7. Effect of transforming Ras on reovirus infection in Tb1.Lu cells.	xxxix

Fig. 8. Long-term reovirus infection of Tb1.Lu cells.....	xxxviii
Figures de l'article 5	xlvi
Fig. 1. Cellules normales et cellules cancéreuses.....	xlvi
Fig. 2. Exemples de stratégies de réplication de certains virus oncolytiques.....	xlvi
Fig. 3. Réovirus au microscope électronique.	xlix

Liste des abréviations

a.a.	Acides aminés
°C	Degré Celcius
%	Pourcentage
α	Alpha
β	Beta
μg	Microgramme
μl	Microlitre
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
db	Double-brins (bicaténaire)
BHK	Baby hamster kidney cells
BRV	Baboon orthoreovirus
BroV	Broome orthoreovirus
CAT	Chloramphénicol acétyltransférase
CMH-I	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CUG2	Cancer upregulated gene 2
eIf2 α	Eukaryotic initiation factor 2 α
EGF	Epidermal growth factor
eGFP	Enhanced green fluorescence protein
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMA	European medicine agency
FAAD	Fas-associated death domain
FAST	Fusion-associated-small-protein
FDA	Food and drugs administration
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Guanine exchange factors
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GMP	Guanosine monophosphate

GTP	Guanosine triphosphate
GTPase	GTP hydrolase
HA	Hémagglutinine
HIF-1a	Hypoxia inductible factor 1a
IFITM	Interferon-inductible transmembrane protein
IFNAR	Interferon-alpha/beta receptor
IFN- β	Interféron beta
IL-10	Interleukine 10
IRF3	Interferon regulatory factor 3
ISG	Interferon-stimulated genes
ISGF3	Interferon-stimulated gene factor 3
ISVP	Par icule sous-virale infectieuse
JAM-A	Junctional adhesion molecule A
KDa	KiloDalton
MEF	Mouse embryonic fibroblast
MEM	Minimum essential medium
MDA5	Melanoma differentiation-associated protein 5
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
ml	Millilitre
MI	Multiplicité d'infection
miRNA	MicroARN
MRV	Mammalian orthoreovirus
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NBV	Nelson Bay orthoreovirus
NF1	Necrosis factor 1
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
ng	Nanogramme
NK	Natural killer cells
nm	Nanomètre
NTG	Nitrosoguanidine
p53	Protéine 53
pb	Paire de base

PBMC	Periferal blood mononuclear cells
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PKR	Protéine kinase dépendante des ARNs bicaténaires
PRV	Piscine orthoreovirus
Ras	Rat sarcoma protein
Rb	Retinoblastoma protein
RIG-I	Retinoic acid-inductible gene-I
RIP1	Receptor interacting protein 1
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
RRV	Reptilian orthoreovirus
SAM	S-adenosyl methionine
SARS	Syndrome respiratoire aigu sévère
SCID	Severe combined immunodeficiency
SDS	Sodium dodécylsulfate
Sos	Son of Sevenless protein
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1
STAT2	Signal transducer and activator of transcription 2
TNF α	Tumor necrosis factor
TGF β	Transforming growth factor beta
TK	Tymidine kinase
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TLR	Toll-like receptors
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
UFP	Unité formatrice de plages
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VGF	Vascular growth factor
VHS	Virus herpès simplex

VSV	Virus de la stomatite vésiculaire
VV	Vaccinia virus
Wt	Wild type (type sauvage)

*À mes grands-parents qui ont dû faire de
nombreux sacrifices afin d'assurer un
meilleur avenir pour leur famille*

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Guy Lemay. Il a su me guider, me conseiller et m'encourager dans mes recherches, et ce, depuis mon arrivée au laboratoire en 2008. Il a toujours été disponible pour répondre à mes nombreuses questions ou pour discuter de résultats qu'ils soient intéressants... ou décevants! Sans son aide précieuse et incomparable, je n'aurais définitivement pas pu accomplir cette thèse et tout ce qui s'y rattache. Merci.

Je voudrais aussi remercier mes parents (Michel Sandekian et Francine Thmain) qui m'ont toujours encouragé à continuer malgré les moments difficiles. Dire qu'à mes débuts, au primaire et au secondaire, je n'aimais pas beaucoup l'école! Grâce à vous, j'ai su persévérer jusqu'au bout de mes aspirations. Merci pour votre support constant et vos phrases d'encouragement typiques, mais toujours appréciées : « T'es bonne, t'es fine, t'es capable! »

Merci à mon fiancé Richard Bourret qui a dû écouter de nombreuses présentations sur mon projet et qui m'a conseillé et encouragé à chaque fois. Merci d'avoir toujours cru en moi et d'avoir su me raisonner et me reconforter lors des périodes où je doutais en mes capacités. Merci d'avoir été aussi patient durant ces années. Merci d'être l'homme de ma vie!

Merci à mes sœurs, mes grands-parents, mes tantes, oncles, cousins, cousines, bref, ma famille et ma belle-famille en entier, qui m'ont tous incité à poursuivre mes recherches et qui voulaient en apprendre davantage sur les virus oncolytiques lors de nos partys de famille. Vous m'avez permis de rester à jour dans le domaine! Merci à mes amis de longue date (Nina, Sarah, Guillaume, Marc-André, ainsi que leurs conjoints) qui ont su me changer les idées lors de nos nombreuses activités en groupe. Je n'échangerais ces moments pour rien au monde. Merci.

Merci à Virginie Brochu-Lafontaine qui m'a tout appris lorsque j'ai commencé en tant que stagiaire au laboratoire. Merci d'avoir répondu à mes nombreuses questions et

pour ta patience et ton amitié. Merci à Roland Jabre, stagiaire à l'époque, mais résident en neurochirurgie aujourd'hui! Merci non seulement pour l'écoute et les conseils, mais aussi pour les nombreuses blagues et « folleries » qui ont su agrémenter les journées qui s'annonçaient ordinaires. Merci à Stéphanie Côté pour la précieuse aide technique durant l'écriture de cette thèse.

Merci aussi aux nombreux stagiaires qui sont passés par le laboratoire. J'ai appris beaucoup avec chacun d'entre vous. En plus de me tenir compagnie, vous m'avez stimulé et supporté plus que vous ne pouvez le penser.

Merci aux autres étudiants du département sans qui les périodes de dîner, les 5 à 7, les soirées de hockey, etc. n'auraient pas été les mêmes. Vous êtes devenus des amis très précieux à mes yeux.

Merci au Dr Vincent Wellemans qui m'a offert son aide dès le début de mes études doctorales et qui a pris le temps de relire mon introduction et d'y apporter corrections et suggestions.

Merci aux membres du jury (Dr Guy Lemay, Dr Tommy Alain, Dr Roger Lippé, Dr Hugo Soudeyns et Dre Carolina Alfieri) d'avoir pris le temps de lire, d'analyser, de commenter et d'évaluer cette thèse.

Merci aux bourses du département et aux bourses de la FESP qui ont supporté financièrement mes études graduées.

Finalement, je voudrais remercier tous les membres ainsi que le personnel du département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie de l'Université de Montréal, en passant par les professeurs, les coordonnateurs des travaux pratiques, les étudiants, les secrétaires, les techniciens, etc. Je remercie aussi les membres du RÉMIC passés et présents. Merci de m'avoir élue à trois reprises. J'ai eu beaucoup de plaisir à contribuer à l'organisation de la « Journée de la Recherche » du département, de l'atelier emploi et des 5 à 7.

1 Caractéristiques générales de Réovirus

1.1 Classification

Les virus de la famille des Reoviridae forment un groupe très diversifié qui inclut des virus de vertébrés (incluant l'humain), d'invertébrés, de plantes et même de certains microorganismes eucaryotes. L'Orthoreovirus de mammifères (MRV), aussi connu sous le nom de réovirus, fait partie de cette famille des Reoviridae sous le genre Orthoreovirus (King et al., 2012). Au niveau structurel, ce genre est caractérisé par la présence de dix segments d'ARN bicaténaire segmentés ayant une taille totale qui varie entre 18-29 kpb et qui sont circonscrits dans une double capsidie protéique. La taille de la particule virale varie entre 70-85 nm de diamètre et forme une structure icosahédrale (Coombs, 2008). Les quatre autres espèces de ce genre sont l'orthoreovirus de babouin (Baboon orthoreovirus, BRV) responsable d'une épidémie de méningite chez des babouins (Victoria et al., 2008), l'orthoreovirus aviaire, responsable de nombreuses infections chez les oiseaux (Deshmukh and Pomeroy, 1969), l'orthoreovirus «Nelson Bay» (NBV) (aussi appelé Pteropine orthoreovirus), infectant les oiseaux et les chauves-souris (Gard and Compans, 1970; Gard and Marshall, 1973) et l'orthoreovirus de reptiles (RRV) isolé chez les serpents (Duncan et al., 2004). Récemment, de nouveaux Orthoreovirus semblent avoir été identifiés et des chercheurs tentent de démontrer qu'ils devraient être considérés comme étant de nouvelles espèces à part entière. Dans cette catégorie, on retrouve notamment le «Broome orthoreovirus» (BroV) qui infecte des chauves-souris frugivores (Thalman et al., 2010), et le «Piscine reovirus» (PRV) découvert en 2010 dans des élevages de saumons (Kibenge et al., 2013; Palacios et al., 2010).

1.1.1 Capacité fusogénique des différentes espèces

Ne disposant pas d'enveloppe à leur surface, les différentes espèces de réovirus ne devraient pas, de prime abord, avoir la possibilité de former des syncytia. Or, certaines espèces de réovirus sont dites fusogéniques étant donnée la présence d'une protéine nommée FAST (fusion-associated-small-protein) (Duncan, 1999; Shmulevitz and

Duncan, 2000). Cette dernière permet de former des syncytia en culture cellulaire (Duncan, 1999). Cette protéine se retrouve à la surface des cellules infectées, mais elle est absente de la particule virale (Ciechonska and Duncan, 2014). Les espèces de réovirus dotés de la protéine FAST et qui sont capables de former des syncytia sont les réovirus aviaires et les réovirus de reptiles (Duncan, 1999). Normalement, les réovirus de mammifères sont non-fusogénique, à l'exception du NBV (Chua et al., 2007; Gard and Compans, 1970), le BRV (Duncan et al., 1995) et le BroV (Dawe and Duncan, 2002; Thalmann et al., 2010). Il faut noter que le BRV est un virus fusogénique ayant la particularité de ne pas avoir de fibre d'adhésion permettant de s'attacher à la surface cellulaire (Yan et al., 2011). Curieusement, cette fibre est aussi absente chez les virus du genre aquareovirus comme le PRV (Cheng et al., 2010; Nason et al., 2000). La capacité de former des syncytia à l'aide de protéines FAST corrèle avec une meilleure relâche virale et une meilleure transmission entre cellules. Aussi, les virus ayant la protéine FAST sont souvent associés à des maladies, contrairement à ceux qui ne l'ont pas (Ciechonska and Duncan, 2014; Duncan and Sullivan, 1998; Salsman et al., 2005).

1.2 Découverte de réovirus et de ses sérotypes majeurs

Initialement, les réovirus portaient le nom de « virus ECHO type 10 » (Enteric Cytopathogenic Human Orphan). Ils étaient classifiés sous l'ancienne nomenclature au sein du groupe des Entérovirus (Committee on the Echo Viruses, 1955; Rosen, 1965). Le terme « réovirus » fut utilisé pour la première fois en 1959 par nul autre que le chercheur ayant développé le vaccin oral contre la polio, Robert Sabin (Sabin, 1959). L'acronyme réovirus provient de « **R**espiratory **E**nteric **O**rphan virus ». Sabin le nomma ainsi étant donné sa présence dans le tractus respiratoire et entérique, mais n'étant lié à aucune pathologie humaine grave chez les individus en bonne santé, l'appellation orphelin fut utilisée (Adams et al., 1982; Ridinger et al., 1982; Sabin, 1959). Ce n'est qu'en 1963 que leur structure génomique d'ARN double brin (ou bicaténaire) segmenté fut découverte, ce qui confirma que le groupe des réovirus était effectivement distinct (Gomatos and Tamm, 1963).

On dénombre quatre sérotypes de réovirus, dont les prototypes sont le T1L (type 1 Lang), T2J (type 2 Jones), le T3D (type 3 Dearing) et le T4N (type 4 Ndelle) (Attoui et al., 2001; Day, 2009; King et al., 2012). Ils ont été divisés ainsi en raison de leur capacité d'héماغlutination et de neutralisation de la protéine de fixation (Rosen, 1960). Le T1L fut le premier type identifié. Celui-ci a été isolé en 1953 d'un écouvillon rectal chez un enfant asymptomatique de Cincinnati, Ohio (Ramos-Alvarez and Sabin, 1954). Les deux autres types (T2J et T3D) furent isolés chez des enfants présentant une diarrhée. Notons qu'une autre variante du type 3 existe; le type 3 Abney (T3A) qui a été isolé en 1957 chez un enfant de Washington D.C. atteint d'une infection des voies respiratoires supérieures (Rosen et al., 1960; Ward et al., 2007). Le T4N a été isolé dans le foie et le cerveau d'une souris et est très peu étudié (Attoui et al., 2001; Zeller et al., 1989). La plupart des recherches sur réovirus se concentrent sur le T1L ou le T3D, qui sont très apparentés (par exemple : gène L1 à 95% similaire, gène M1 à 98%) (Coombs, 2008). Dans cette thèse, le T3D qui est la souche la plus étudiée, a été principalement utilisée.

1.2.1 Symptômes associés et nouveaux cas cliniques

Réovirus étant ubiquitaire, on note qu'environ 50 % de la population humaine possède des anticorps anti-réovirus (Jackson and Muldoon, 1973; Kelly et al., 2009). Comme son nom l'indique, les symptômes qui le caractérisent s'apparentent souvent à un rhume, une grippe ou une gastroentérite mineure (Jackson and Muldoon, 1973; Rosen et al., 1963; Sabin, 1959). On note aussi de rares cas de méningites chez de jeunes enfants (Johansson et al., 1996; Tyler, 1998; Tyler et al., 2004). Signalons également que certaines maladies ont été rapportées chez les nouveau-nés humains lors d'une infection par réovirus tels que l'atrésie des voies biliaires (Kahn, 2004).

Par contre, chez la souris néo-natale ou immunodéficiente, réovirus peut avoir plusieurs effets pathogéniques importants pouvant être létaux (King et al., 2012). Sa dissémination neurotropicque à partir d'une infection initiale au niveau du système respiratoire ou du tractus gastro-intestinal ont fait de réovirus un candidat intéressant pour plusieurs études de pathogénèse virale utilisant la souris comme modèle expérimental

(Ward et al., 2007). La maladie du pied noir chez les souris SCID-NOD a aussi été rapportée (Loken et al., 2004). De plus, tel que mentionné précédemment, les orthoréovirus possèdent un large tropisme d'hôtes en passant par les oiseaux, les reptiles et les chauves-souris. On estime que presque tous les mammifères, incluant l'humain, seraient susceptibles à une souche de réovirus (Dermody et al., 2013).

1.2.1.1 Les chauves-souris : des réservoirs pour un réovirus pathogène?

Dans les manchettes, on parle de plus en plus des virus hautement pathogènes et mortels qui sont transmis par les chauves-souris (ex : virus Nipah, Hendra, SARS et plus récemment, Ebola (O'Shea et al., 2014; Vogel, 2014; Wang et al., 2011)). Ces virus sont, dans la plupart des cas, asymptomatiques chez la chauve-souris. Des études avancent que les chauves-souris représenteraient le réservoir zoonotique de virus le plus important avec plus de 60 espèces de virus (Wong et al., 2007). Cette capacité qu'elles ont de coexister avec les virus serait le résultat d'un contrôle rapide de la réplication virale tôt dans la réponse immunitaire (Baker et al., 2013).

En ce qui concerne réovirus, il a été observé ces dernières années que les chauves-souris frugivores seraient des réservoirs importants (Pritchard et al., 2006; Thalmann et al., 2010). En effet, de nouveaux réovirus ont été caractérisés comme faisant partie de l'espèce NBV (Chua et al., 2007; Du et al., 2010; Pritchard et al., 2006). Étant traditionnellement caractérisé comme orphelin, plusieurs chercheurs se demandent si réovirus serait désormais en cours d'évolution et d'adaptation en vue de devenir une maladie émergente (Wong et al., 2012). Il y a effectivement eu des cas de transmission de différents types de réovirus à l'humain à partir de contact avec des chauves-souris et même d'humains à humains (Cheng et al., 2009; Chua et al., 2007, 2008, 2011). Dans ces cas, les symptômes observés sont plus souvent sévères que lors d'une infection par le réovirus de mammifère précédemment décrit. En effet, des symptômes respiratoires aigus, de fortes fièvres et parfois des diarrhées aiguës et des vomissements ont été répertoriés. Ces réovirus ont été isolés en Malaisie (Pulau virus, Melaka virus, Kampar virus, Sikamat virus), en Australie (NBV) et en Chine (Xi River virus et HK23629/07). Récemment, trois

nouveaux isolats ont été répertoriés en Allemagne, l'un d'entre eux faisant partie du sérotype 3 de mammifère (nommé T3/Bat/Germany/342/08) (Kohl et al., 2012).

Mentionnons que les chauves-souris possèdent de nombreuses caractéristiques qui font d'elles de bons réservoirs viraux. Elles sont les seuls mammifères ayant la capacité de voler, ce qui a contribué à favoriser la transmission interespèces (O'Shea et al., 2014). De plus, il y aurait environ 1240 espèces de chauves-souris, ce qui représente plus de 20% des espèces de mammifères (Wang et al., 2011). Leur durée de vie est de 25 à 35 ans et elles vivent souvent au sein de groupes densément peuplés (parfois plusieurs millions), ce qui accroît les opportunités de transmission au sein du groupe, mais qui donne aussi lieu à la co-évolution du virus avec son hôte et sa persistance (Wang et al., 2011).

Considérant l'importance grandissante des chauves-souris en lien avec la propagation et la pathogénicité de plusieurs virus, nous avons mené une étude relative à la réplication de réovirus dans des cellules de chauves-souris (Sandekian et al., 2013). Cette étude, menée en parallèle avec les travaux principaux présentés dans cette thèse, est donc présentée en annexe (**Annexe 1**). Nous avons notamment démontré que les cellules de chauve-souris sont résistantes à l'action cytolytique de réovirus T3D et qu'elles sont en mesure de se débarrasser en partie du virus en se protégeant grâce à un facteur antiviral qu'elles induisent. Néanmoins, il reste qu'un certain niveau de réplication virale subsiste dans ces cellules après une longue période de temps. Ces raisons pourraient expliquer, du moins en partie, le fait que ces animaux puissent servir de réservoir pour réovirus.

1.3 Structure générale du virus

Au niveau structural, la particule virale possède une double capsidie protéique, mais elle n'est pas enveloppée. La symétrie de cette capsidie est icosaédrale (N=12) et sa taille varie de 70-80 nm (excluant la fibre sigma1). De l'extérieur vers l'intérieur, on y retrouve la capsidie externe puis la capsidie interne nommée nucléoïde ou « core » (Dermody et al., 2013). Une coiffe est présente à l'extrémité 5' du brin positif (brin codant) de chacun des 10 segments d'ARN double-brins qui ne sont cependant pas polyadénylés (Dermody et al., 2013; Nibert et al., 1996). Aussi, chacun de ces gènes

possède à son extrémité la séquence suivante sur le brin positif : 5'-GCUA et UCAUC-3'. Ces régions conservées seraient impliquées dans la reconnaissance, que ce soit au niveau de la transcriptase, de la réplicase ou encore lors de l'incorporation des ARN viraux dans les nouvelles particules virales (King et al., 2012).

Les dix segments d'ARNdb sont divisés en trois groupes en fonction de leur taille. Les plus lourds (3.8-3.9 kpb) sont les segments dits « larges » ou « L », les moyens dénommés « medium » (ou « M ») sont de 2.2 à 2.3 kpb et finalement les petits « small » (ou « S ») sont d'une taille variant entre 1.2 et 1.5 kpb. Il y a 3 segments larges, 3 moyens et 4 petits. Chacun de ces segments encode une seule protéine (sauf S1 et M3 qui encodent deux protéines chacun selon un cadre de lecture différent ou un codon d'initiation différent) (Ernst and Shatkin, 1985; Jacobs and Samuel, 1985; Jacobs et al., 1985). Les protéines sont aussi classées selon leur taille, mais sont identifiées par la lettre grecque correspondante. Ainsi les protéines encodées par les segments L sont les λ (lambda), les M sont les μ (mu) et les S sont représentés par σ (sigma). Leur numérotation a été établie selon leur patron de migration génomique et protéique, ce qui explique la discordance observée chez certains gènes (Dermody et al., 2013; Nibert et al., 1996). Le tableau ci-dessous (**Tableau I**) résume les protéines associées à chaque gène ainsi que leurs fonctions pour le T3D (Dermody et al., 2013).

Tableau I : Liste des gènes de réovirus ainsi que leurs fonctions associées.

Adaptée de (Dermody et al., 2013)

Gène (taille pb)	Protéine (taille a.a.)	Poids (kDa)	Localisation	Fonctions associées
L1 (3854)	$\lambda 3$ (1267)	142.3	Core	ARN polymérase ARN-dépendante. S'associe avec la protéine μ NS.
L2 (3916)	$\lambda 2$ (1289)	144	Transcapsidique	Forme un tunnel pentamérique qui permet l'insertion de la protéine d'attachement sigma 1. Guanylyl transférase et méthyltransférase.
L3 (3901)	$\lambda 1$ (1275)	142	Core	ARN hélicase. Enlève le phosphate terminal des ARNm nouvellement transcrits.
M1 (2304)	$\mu 2$ (736)	83.3	Core	Sous-unité de l'ARN polymérase. Stabilise les microtubules. Enlève le phosphate terminal des ARNm nouvellement transcrits. Attachement non-spécifique à l'ARN. Antagoniste de l'interféron.
M2 (2203)	$\mu 1$ (708)	76.4	Capside externe	Se lie à $\sigma 3$. Subit plusieurs clivages lors de l'entrée. Pénétration de l'endosome. Influence l'efficacité de l'apoptose.
M3 (2241)	μ NS (721)	80	Non-structurale	Formation d'inclusion cytoplasmique. S'associe avec σ NS, $\lambda 1$, $\lambda 2$, $\lambda 3$, $\mu 2$ et $\sigma 2$ et avec l'ARNm viral.
	μ NSC (681)	75	Non-structurale	Fonction inconnue. Pas essentielle pour la réplication en culture cellulaire.
S1 (1416)	$\sigma 1$ (455)	49.2	Capside externe	Protéine d'attachement. Se fixe sur les surfaces cellulaires glycosylées et sur JAM-A. Possibilité d'une activité mucinolytique. Détermine le sérotype viral, le tropisme tissulaire et la dissémination au sein de l'hôte.
	$\sigma 1s$ (120)	14	Non-structurale	Responsable de l'arrêt du cycle cellulaire. Requisite pour la dissémination sanguine.
S2 (1331)	$\sigma 2$ (418)	47.2	Core	S'associe avec μ NS. Se lie faiblement à l'ARNdb.
S3 (1189)	σ NS (366)	41	Non-structurale	Retrouvée tôt dans les inclusions virales. S'associe avec μ NS. Attachement non-spécifique à l'ARN. Se lie fortement à l'ARN simple brin.
S4 (1196)	$\sigma 3$ (365)	41.5	Capside externe	Fonction stabilisatrice de la capsid. Protège $\mu 1$. Attachement non-spécifique à l'ARNdb. Influence l'efficacité de la traduction. S'associe avec les ARNm viraux tôt dans le cycle de réplication. Inhibe l'activation de PKR.

Réovirus est composé de huit protéines structurales : $\mu 1$, $\sigma 1$ et $\sigma 3$ sont situées sur la capsid externe et $\lambda 1$, $\lambda 3$, $\mu 2$, et $\sigma 2$ se trouvent dans la capsid interne. La protéine $\lambda 2$ est considérée comme «transcapsidique» puisqu'elle est ancrée dans la capsid interne, mais traverse la capsid externe jusqu'à la surface de la particule virale. Lors de la décapsidation, discutée plus en détail dans la section suivante, des enzymes dégradent et clivent certaines protéines de la capsid externe (**Fig. 1.**). Les virions comportant deux capsides passent alors à la forme partiellement décapsidée ou ISVP (infectious subviral particle) pour ultimement devenir des cores (nucléoïdes) soit la forme transcriptionnellement active.

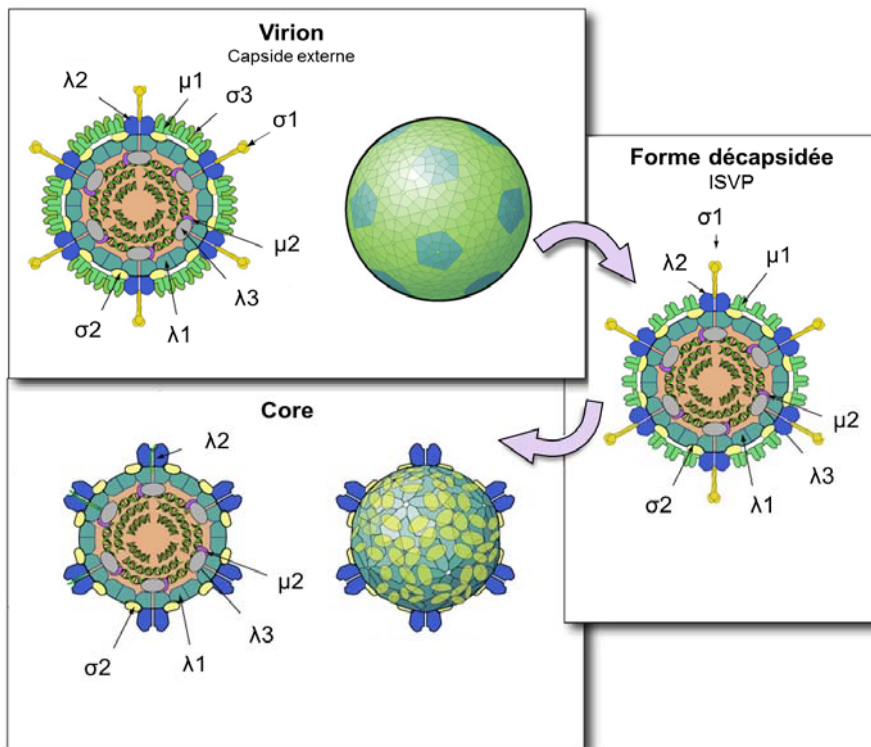


Fig. 1. Les différentes formes de réovirus.

Sous la forme virion, on peut observer les différentes protéines de la capsid externe. C'est la forme la plus stable du virus. Lors de la décapsidation, la protéine sigma3 sera dégradée et $\mu 1$ sera clivée, c'est la forme ISVP. Finalement, la forme core est constituée des protéines de la capsid interne. Les cores ne sont pas infectieux mais sont transcriptionnellement actifs. Adaptée de (Viral Zone, 2014)

1.4 Cycle de réplication

Brièvement, le cycle de réplication du réovirus de mammifère débute par la fixation de la protéine virale signal aux acides sialiques (Barton et al., 2003) et à JAM-A (Antar et al., 2009), les deux principaux récepteurs cellulaires du virus (**Fig. 2.**). D'autres récepteurs pourraient aussi être impliqués, tel que discuté plus loin. Le virus est ensuite internalisé grâce aux β -intégrines. Il se retrouvera alors dans des endosomes clathrine-dépendants où il subira la décapsidation de sa capsid externe, grâce à l'action de diverses protéases provenant du lysosome pour former des ISVPs (Dermody et al., 2013). Récemment, de nouvelles évidences suggèrent qu'il y aurait, en plus des mécanismes clathrine-dépendants, des voies calvéoline-dépendantes (Dermody et al., 2013; Laniosz et al., 2008; Querbes et al., 2006). Une étude récente a également démontré que réovirus est transporté des endosomes précoces aux endosomes tardifs et transite parfois dans les endosomes de recyclage (Mainou and Dermody, 2012). La protéine cellulaire qui sert d'attachement à réovirus, JAM-A, est retrouvée dans chacun de ces compartiments endosomaux. Les auteurs spécifient que seules les particules transitant dans les endosomes précoces et tardifs pourront mener à une infection productive (Mainou and Dermody, 2012). Une autre addition récente dans le phénomène d'entrée cellulaire est que réovirus utilise le réseau de microtubules pour traverser les différentes voies endosomales. Les microtubules facilitent le transit vers les endosomes acidifiés afin d'enclencher la décapsidation (Mainou et al., 2013). La décapsidation est une étape limitante à l'infection du virus. Elle dépend du contenu endosomal en protéases ainsi que de l'acidité du milieu. Certaines cellules sont dites restrictives, car elles décapsident mal le virus (ex : cellules Vero). Mentionnons qu'un virus préalablement décapsidé en ISVP, à l'aide d'un environnement extracellulaire riche en protéases par exemple, serait en mesure d'entrer directement au sein de la cellule et contournerait ainsi l'étape de décapsidation dans les endosomes. Ensuite, les ISVPs subiront d'autres clivages protéolytiques pour former des ISVPs* qui permettent subséquentement l'entrée du virus à l'intérieur du cytoplasme; s'ensuivent alors des étapes de transcription et traduction du génome à partir des cores. Soulignons que les cores ne sont pas infectieux, contrairement aux ISVPs. La transcription primaire permet la synthèse des 10 ARNm coiffés. La machinerie cellulaire traduira ensuite ces ARNm pour

former les protéines virales. De plus, ces protéines nouvellement formées iront s'associer aux ARNm afin de former des complexes qui serviront à la synthèse des brins d'ARN négatifs. Les ARNm viraux seront aussi transcrits par des protéines virales (transcription secondaire). Mentionnons que les ARNm de la transcription secondaire ne possèdent pas de coiffe et sont pas encapsidés dans les nouveaux virus formés (Dermody et al., 2013). Finalement, il y aura assemblage de nouvelles particules virales qui seront relâchées par divers mécanismes incluant la lyse cellulaire et l'apoptose.

Le cycle viral se déroulerait entièrement au niveau du cytoplasme cellulaire, bien que certaines données indiquent que les protéines sigma1s et sigma3 seraient transportées au noyau (Bergeron et al., 1998; Coombs, 2008; Dermody et al., 2013; Miller and Samuel, 1992; Nibert et al., 1996; Yue and Shatkin, 1996). Notons également que la synthèse d'ARNm viraux, la réplication du génome et l'assemblage de particules se déroulent dans des structures nommées inclusions virales (ou usines à virus). Ces structures sont situées dans le cytoplasme de la cellule infectée et sont formées principalement grâce à la protéine muNS (Miller et al., 2010). Ces inclusions, qui nécessitent une structure stabilisante telle que les microtubules recrutées par la protéine mu2, sont visibles au microscope optique et peuvent avoir différentes morphologies, selon le sérotype de réovirus (filamenteuses, globulaires ou granuleuses) (King et al., 2012).

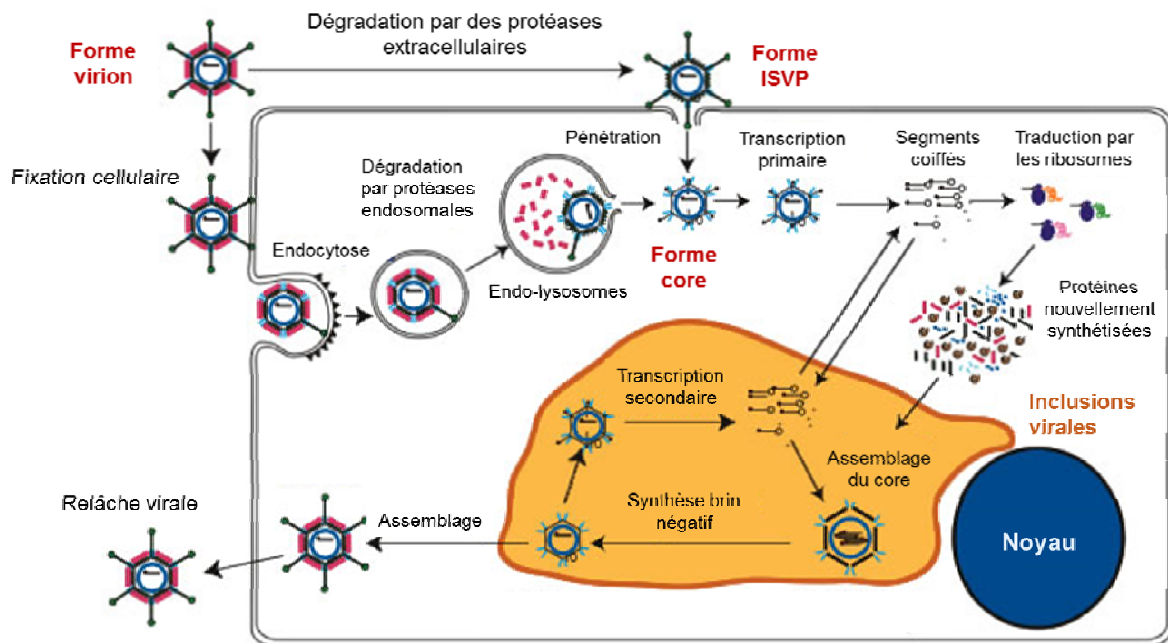


Fig. 2. Cycle de réplication de réovirus.

Adaptée de (Parker, 2008)

1.5 Protéines importantes au projet et leurs fonctions

Dans cette thèse, nous nous concentrerons principalement sur les protéines impliquées dans la fixation de la particule virale à la surface cellulaire, la décapsidation virale, l'entrée cellulaire ainsi que l'activité méthyltransférase du virus. Les protéines qui seront donc étudiées sont sigma1, sigma3, mu1 et lambda2. Les différentes protéines impliquées dans la formation des inclusions ne seront pas donc pas davantage examinées dans cette thèse ni les protéines impliquées dans la transcription et la réplication du génome, sauf en ce qui concerne la protéine lambda2.

1.5.1 Sigma1

1.5.1.1 Structure

Au niveau structurel, sigma1 est une fibre qui varie de 455 à 470 a.a. selon les sérotypes (sigma 1 de T3D est de 455 a.a.) qui s'étend jusqu'à 40 nm de la surface de la particule virale selon des données basées sur le T2J (Dermody et al., 2013; Furlong et al., 1988). Sommairement, elle est composée d'une queue, d'un corps et d'une tête globulaire (**Fig. 3D.**) (Danthi et al., 2010; Fraser et al., 1990). Les régions de la tête et du corps sont importantes pour la capacité d'hémmaglutination de réovirus et par le fait même pour la détermination du sérotype. Nous nous concentrerons ici sur le T3D. La tête, comprise entre les résidus 310 à 455, possède des motifs de deux clés grecques soit 8 feuilletts β antiparallèles qui se connectent entre eux (Chappell et al., 2002; Danthi et al., 2010; Schelling et al., 2007). La région corps (résidus 170 à 309) est constituée de répétitions de double feuilletts β antiparallèles interconnectées par de courtes boucles. Une triple β spirale est formée lorsqu'on retrouve trois unités assemblées (Dermody et al., 2013). La queue, qui n'a jamais pu être cristallisée, est comprise entre les régions 1 à 160 et est la région d'insertion à la capsid (Furlong et al., 1988). Son assemblage est de type homotrimère (Nibert et al., 1990). Sous forme monomérique, elle ne peut exercer ces fonctions d'attachement (fixation) et elle devient très sensible aux protéases (Dermody et al., 2013). Elle est ancrée dans la particule virale via sa partie N-terminale dans les canaux formés par des pentamères de la protéine lambda2 (Hayes et al., 1981). À la surface du virion, on dénombre entre 36 et 48 exemplaires de la protéine sigma1. Sous la forme virion, sigma1 est repliée comparativement à une forme plus étirée à la surface des ISVPs (Furlong et al., 1988). De façon intéressante, la structure de sigma1 possède de fortes ressemblances avec la fibre de fixation d'adénovirus (Chappell et al., 2002; Coombs, 2008; Stehle and Dermody, 2003).

1.5.1.2 Protéine de fixation et ses récepteurs cellulaires

Sigma1 est la protéine de fixation du virus. Ses récepteurs à la surface cellulaire sont les acides sialiques, des glycanes GM2 selon les sérotypes, JAM-A (aussi connu sous

le nom de JAM-1) ainsi que NgR1 selon le type cellulaire (van den Hengel et al., 2012; Konopka-Anstadt et al., 2014). La fixation est un processus qui nécessite plusieurs étapes. Tout d'abord, sigma1 s'attache avec une faible affinité aux acides sialiques et par la suite la fixation via JAM-A renforce l'interaction étant donné sa plus forte affinité (Danthi et al., 2010; van den Hengel et al., 2012; Kobayashi et al., 2007). La protéine lambda2 sécurise finalement cette interaction via sa liaison avec la β 1-intégrine pour enclencher l'internalisation du virus (van den Hengel et al., 2012; Maginnis et al., 2006, 2008).

1.5.1.2.1 Interaction avec les acides sialiques

Les acides sialiques sont retrouvés à la surface des cellules épithéliales des voies respiratoires et du système digestif où elles permettent l'adhésion entre cellules. Elles jouent également un rôle important au niveau de la signalisation cellulaire en ce qui concerne l'immunité et le développement (Stencel-Baerenwald et al., 2014). Ce sont des monosaccharides de 9 chaînes de carbones, dont le C5 est souvent N-acétylé (Neu5Ac) et parfois même hydroxylé (Neu5Gc). Les glycoprotéines et les glycolipides sont souvent reliés aux acides sialiques via une liaison α au niveau de leur C2. Ils sont souvent considérés comme étant des récepteurs pour de nombreux pathogènes tel que le *Vibrio cholerae*, Adénovirus, Influenza, Rotavirus et Réovirus (Stencel-Baerenwald et al., 2014).

La partie centrale de sigma1 (résidus 174-238, feuillet β) sert de lieu de fixation aux acides sialiques de type α 2-3, α 2-6 ou encore α 2-8 Neu5Ac. Curieusement, pour le T1L, c'est la partie globulaire de la tête qui sert de fixation et ce, uniquement envers les gangliosides de type GM2 (Reiss et al., 2012; Reiter et al., 2011). D'autres études ont établi que les résidus 198 à 205 de sigma1 sont responsables de la fixation aux acides sialiques (**Fig.3A,B,C.**) (Dermody et al., 1990). Récemment, il a été démontré que le résidu 202 aurait une grande importance puisque le Neu5Ac y serait ancré par un pont salin (Reiter et al., 2011).

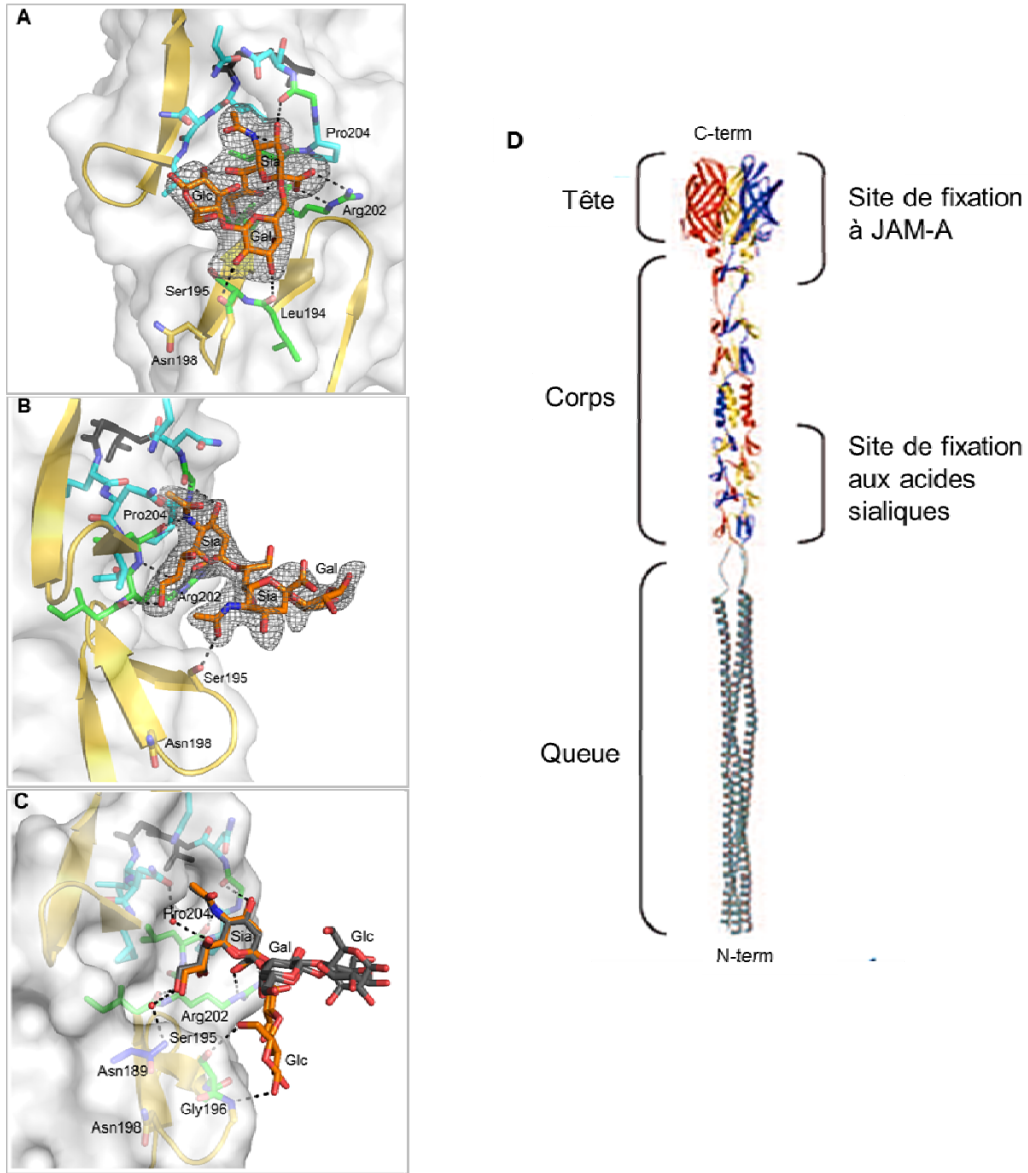


Fig. 3. Protéine sigma1 cristallisée en complexe avec différentes formes d'acides sialiques et résidus impliqués dans ces interactions.

Région de sigma1 fixée aux A) α -2,6-sialyllactose, aux B) α -2,8-disialyllactose et aux C) α -2,3-sialyllactose. D) Trimère de sigma1 formées des monomères illustrés en rouge, jaune et bleu. Les sections tête, corps et queue sont indiquées ainsi que la région des différents sites de fixation aux protéines cellulaires. Adaptée de (Dermody et al., 2013; Reiter et al., 2011)

Mentionnons également que sigmal est la protéine responsable de l'hémagglutination du virus. Lorsque purifiée, elle peut agglutiner les globules rouges humains (érythrocytes O) (Weiner et al., 1978). Ce sont les acides sialiques présents à la surface des globules rouges, surtout le glycophorin A, qui permettent au virus de s'attacher (Paul and Lee, 1987). Notons qu'*in vitro*, on peut enlever les acides sialiques présents sur les surfaces cellulaires à l'aide d'un traitement à la neuraminidase (Barton et al., 2001; Connolly et al., 2001).

1.5.1.2.2 Interaction avec JAM-A

JAM-A est une protéine transmembranaire de type I de 25 kDa située dans les jonctions serrées entre les cellules endothéliales et épithéliales (Boehme et al., 2013a). Celle-ci régule la fonction de barrière épithéliale ainsi que la migration et la prolifération de ces cellules (Monteiro et al., 2013). Curieusement, certaines cellules cancéreuses expriment faiblement JAM-A (Gutwein et al., 2009; Naik et al., 2008).

JAM-A sert de récepteur pour tous les sérotypes de réovirus (Barton et al., 2001; Campbell et al., 2005; Prota et al., 2003). Les résidus se liant à JAM-A sont le T380, G381, et N382 de la tête de sigmal (Danthi et al., 2010; Forrest et al., 2003; Kirchner et al., 2008). De plus, chacun des monomères de sigmal composant le trimère s'attache sur une molécule de JAM-A différente (Kirchner et al., 2008). Une liaison préalable aux acides sialiques n'est pas requise pour qu'il y ait fixation via JAM-A (Barton et al., 2001). Suite à la fixation des acides sialiques et de JAM-A, le virion sera internalisé à l'aide des β -intégrines cellulaires. Notons que la forme ISVP peut pénétrer dans la cellule indépendamment de celles-ci (Maginnis et al., 2006).

La découverte de JAM-A comme récepteur principal de réovirus n'était pas suffisante pour expliquer l'infection d'autres types cellulaires dépourvus de cette protéine. C'est le cas des cellules neuronales. Rappelons que de rares cas d'encéphalites chez de jeunes enfants ont été répertoriés chez les humains (Ouattara et al., 2011). Dans le cas de la souris nouveau-née, il avait déjà été démontré que réovirus pouvait se répliquer dans le système nerveux central suite à une inoculation par voie orale (Antar et al., 2009;

Morrison et al., 1991; Oberhaus et al., 1997). Or, dans les cellules neuronales, JAM-A n'est pas essentiel à l'infection de réovirus puisque des souris JAM-A^{-/-} sont tout de même affectées au niveau neurologique (Antar et al., 2009). De plus, un virus mutant pour la fixation aux acides sialiques (R202W) parvenait tout de même à cibler le cerveau de souris inoculée par voie intramusculaire, mais avec une virulence amoindrie (Frierson et al., 2012).

1.5.1.2.3 Un nouveau récepteur identifié, NgR1

Récemment, un autre récepteur de réovirus a été identifié à la surface des cellules neuronales, soit le NgR1 (Konopka-Anstadt et al., 2014). Le récepteur Nogo (NgR1) est une protéine ancrée à la surface des neurones. Dans des conditions d'activation normale, cette protéine induit une signalisation permettant la régulation de la plasticité des axones dans les phases précoces du développement du cerveau. Aussi, chez les adultes, elle permet la croissance des axones dans le système nerveux central (Konopka-Anstadt et al., 2014). Étonnamment, il semble que sigma1 soit plus ou moins impliquée dans cette fixation puisque les ISVPs ne s'attachent pas à NgR1 contrairement aux virions. Il est possible que ce soit le réarrangement de sigma1 lors de la transformation en ISVP (Dryden et al., 1993; Furlong et al., 1988) qui masque le site de liaison à NgR1, ou encore qu'une autre protéine virale soit impliquée dans la fixation (Konopka-Anstadt et al., 2014). Cette explication serait possible puisque, tel qu'énoncé précédemment dans la section 1.1.1, les BRV ne possédant pas de fibre utilisent la protéine sigmaB (homologue de sigma3) comme composante responsable de la fixation de particule virale (Yan et al., 2011). D'autres études sont requises pour mieux comprendre la fixation du virion à la surface des cellules neuronales.

1.5.1.3 Autres rôles

Au niveau génétique, S1 est le gène qui comporte le plus de variations entre les différents sérotypes (27% de similarité entre T1L et T3D) (Coombs, 2008; Duncan et al., 1990). Lors d'études de persistance virale, des mutations sur sigma1 peuvent survenir dans la chaîne α de la queue, réduisant ainsi la stabilité de l'oligomère et sa capacité

d'entrée au sein de la cellule (Wilson et al., 1996). Cet aspect sera discuté plus en détail dans la section 3.2.

En ce qui concerne l'activation de l'apoptose, le gène S1 aurait un rôle déterminant à jouer via sa protéine non structurale sigma1s (Boehme et al., 2013b; Tyler et al., 1995). L'apoptose serait aussi activée par mu1, mais de façon plus importante et préalablement à la formation de sigma1s (voir section 1.5.3.3). Néanmoins, on peut tout de même conclure qu'elle est induite tôt suite à l'infection par réovirus (Connolly et al., 2001; Tyler et al., 1996).

Selon quelques études menées dans notre laboratoire, sigma1 aurait une activité enzymatique de type mucinolytique. La mucine est une protéine glycosylée qui est, en quelque sorte, une barrière physique contre plusieurs pathogènes. Elle est située à la surface des cellules épithéliales, mais peut aussi être sécrétée. Notons qu'elle serait surexprimée chez certaines cellules cancéreuses (Kufe, 2009). Sachant que réovirus cible ce type de cellule et que celles-ci sont recouvertes de mucine, il est logique de penser que réovirus ait une façon d'outrepasser cet obstacle. En plus d'une homologie de séquence avec le lysozyme (Bisaillon and Lemay, 1999), il a été démontré que la forme ISVP (mais pas les virions) ainsi que la protéine sigma1 recombinante, peuvent hydrolyser la mucine. Le site d'activité se retrouverait donc dans la conformation relâchée de sigma1 où le résidu E36 serait responsable de l'hydrolyse et D54 se lierait à la mucine (Bisaillon et al., 1999). Dernièrement, il a été démontré qu'un mutant au site P204L ayant perdu sa capacité de fixation aux acides sialiques regagne son infectivité lorsque cette mutation est combinée avec la substitution E36Q. Une meilleure fixation aux acides sialiques ne semble pas être responsable de ce phénotype. Celui-ci pourrait plutôt être relié à une altération de la structure tertiaire du trimère de sigma1 étant donné qu'il a déjà été rapporté que des substitutions d'acides aminés de l'extrémité N-terminale sont impliquées dans ce phénomène (Brochu-Lafontaine, 2012).

Un autre aspect intéressant avec sigma1 est son rôle dans la détermination du tropisme du virus. Tel que discuté dans la prochaine section, réovirus est actuellement à l'étude en essai clinique comme virus oncolytique. Un des concepts étudiés serait de

modifier le tropisme de réovirus afin de diriger l'infection (Brochu-Lafontaine, 2012). Au laboratoire, une collègue est parvenue à rajouter une étiquette peptidique d'une taille variant entre 6 et 40 acides aminés, tout en conservant l'infectivité du virus. Par contre, un fragment de 239 acides aminés (YFP) n'a pas engendré de virus infectieux, et ce même lors d'ajout d'un codon stop en 5' du YFP. Ceci souligne que pour préserver l'infectivité, la longueur maximale requise pour l'encapsidation de l'ARN ou la structure secondaire ou tertiaire de la protéine doivent être respectées (Brochu-Lafontaine and Lemay, 2012). Il est donc possible de rajouter des molécules sur sigma1, ce qui pourrait potentiellement aider au ciblage de cellules cancéreuses. En effet, chez plusieurs cellules cancéreuses, le récepteur au virus peut être masqué ou sous-exprimé. Contrôler le tropisme de réovirus en modifiant la protéine de fixation sigma1 est donc une avenue intéressante pour optimiser son potentiel oncolytique.

1.5.2 Sigma3

1.5.2.1 Structure

Les protéines de la capsid externe sont impliquées dans divers phénomènes du cycle de réplication du virus. En effet, sigma3 (codé par le gène S4) assure la stabilité du virus (Dermody et al., 2013; Nibert et al., 1996). Sa taille est de 365 a.a. (41 kDa) et elle forme un hétérohexamère avec la protéine mu1 et constitue la capsid externe du virus. Autrement dit, pour trois sigma3 on retrouve trois mu1 (**Fig.4**). Ces deux protéines comptent parmi les plus abondantes au sein du virion. En effet, on en dénombre 600 exemplaires chacune (Dermody et al., 2013). L'interaction entre mu1 et sigma3 est très importante pour diverses fonctions du virus et a un impact direct sur les rôles assumés par ces mêmes protéines. Assemblées, elles assurent notamment la stabilité structurale au virus, mais lors du désassemblage, les formes libres de ces protéines assurent d'autres fonctions qui leur sont propres. Celles-ci seront discutées en détail dans les prochaines sections.

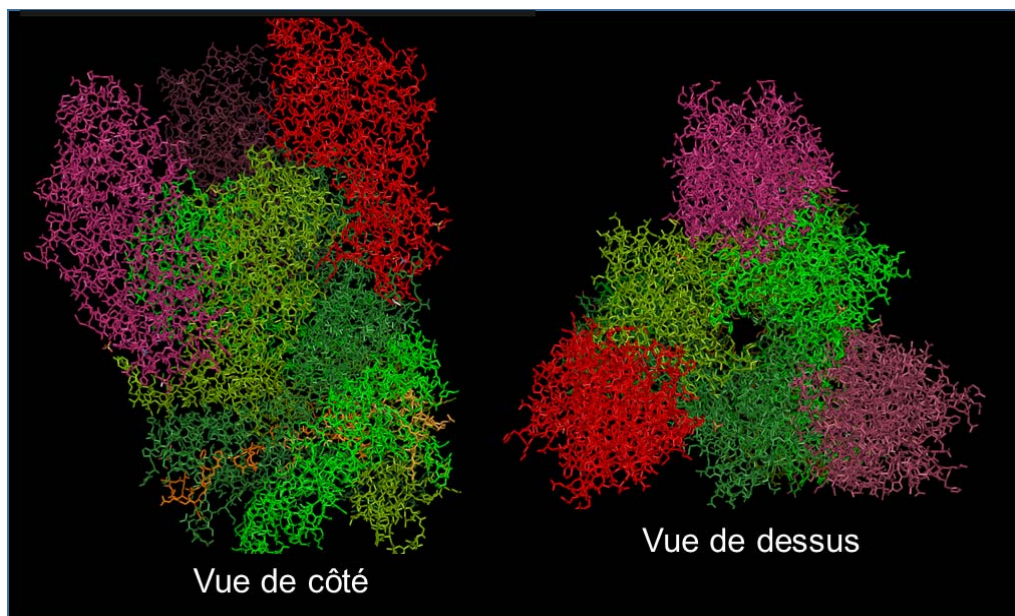


Fig. 4. Hétérohexamère de sigma 3 et mu1.

Trois sigma3 sont illustrés en divers tons de pourpre et trois mu1 en tons de vert. Adaptée de (Liemann et al., 2002).

1.5.2.2 Rôle dans la décapsidation

Lors de la décapsidation, sigma3 est complètement dégradée par des protéases et mu1 (encodée par le gène M2) est clivée, ce qui permet la formation d'ISVP. La décapsidation se déroule à l'intérieur des endosomes dans un environnement à pH acide (Sturzenbecker et al., 1987) via des protéases à cystéines (Baer and Dermody, 1997). En laboratoire, la chymotrypsine permet de transformer *in vitro* les virions en ISVPs ou en cores, selon le temps d'incubation et la concentration de l'enzyme (Golden et al., 2002; Madren et al., 2012). Au niveau cellulaire, il a été démontré que les cathepsines B et L sont responsables de la décapsidation chez les cellules fibroblastiques (Ebert et al., 2002). Dans l'organisme, la formation extracellulaire d'ISVPs peut survenir à l'aide de protéases du lumen gastro-intestinal ou encore du tractus respiratoire (Bodkin et al., 1989; Nygaard et al., 2012). Aussi, plusieurs mutants de décapsidation ont été sélectionnés par

persistance sur différentes lignées cellulaires et la majorité d'entre eux possèdent des substitutions d'acides aminés sur le domaine C-terminal de sigma3, ce qui favorise la décapsidation virale (Y354H par exemple) (Danthi et al., 2010; Wetzel et al., 1997; Wilson et al., 2002). Une autre étude a permis de conclure qu'une substitution d'acide aminé, G198E, permet de renverser le phénotype déstabilisant de Y354H (Doyle et al., 2012). La persistance cellulaire de réovirus sera discutée plus en détail dans la section 3.2.

1.5.2.3 Autres rôles

L'un des rôles principaux de sigma3 est d'assurer la stabilité du virion dans l'environnement (Coombs, 2008). En effet, les virions sont résistants aux traitements par des solvants organiques, des détergents, aux pH acides et aux températures élevées (Gomatos and Tamm, 1962; Sabin, 1959; Schiff, 1998).

Sigma3 aurait également un rôle important à jouer au niveau de la synthèse protéique. En effet, la partie C-terminale de sigma3 a la capacité de lier l'ARNdb de façon séquence-indépendante et empêcherait l'inhibition de la synthèse protéique de la cellule en inhibant PKR et par le fait même, la phosphorylation de eIF2 α (eukaryotic initiation factor 2 α) (Huisman and Joklik, 1976; Nibert et al., 1996). Ce faisant, elle inhiberait également l'induction d'une molécule antivirale, soit l'interféron (IFN) (Imani and Jacobs, 1988). Ces fonctions de sigma3 dépendent non seulement de sa distribution cellulaire, mais aussi de son interaction avec mu1C (Coombs, 2008; Schmechel et al., 1997). Le domaine de liaison à l'ARNdb, serait composé de motifs d'acides aminés basiques dans la région 234-240 et 289-297 (Beattie et al., 1995; Denzler and Jacobs, 1994; Huisman and Joklik, 1976; Lloyd and Shatkin, 1992; Mabrouk et al., 1995; Schmechel et al., 1997; Wang et al., 1996). D'autres auteurs suggèrent toutefois que la formation d'un dimère de sigma3 composé des résidus 2, 4-7, 9, 10, 47, 57, 60, 62, 312, 313, 333 et 334 dans le lobe plus petit et des résidus 164, 250, 254-257, 276-279, 338 et 342 dans le lobe plus grand serait plutôt responsable de cette liaison, puisque l'affinité pour l'ARN serait renforcée (Olland et al., 2001). Sigma3 possède également un motif en doigts de zinc entre les résidus 51 et 73 favorisant l'association à mu1 (Schiff et al., 1988; Shepard et al., 1996). Cette fonction serait importante pour le repliement et la stabilité

intracellulaire de la protéine afin de maintenir les interactions protéines-protéines (Coombs, 2008; Mabrouk and Lemay, 1994; Schiff et al., 1988; Shepard et al., 1996).

1.5.3 Mu1

1.5.3.1 Structure

Organisée en 4 domaines structuraux, cette protéine de 708 a.a. est tellement nombreuse sur le virion (600 copies, comme sigma3) qu'elle constitue la moitié du poids total de celui-ci. (Coombs, 2008; Liemann et al., 2002). Les trois premiers domaines (domaine I, II, III) sont constitués d'hélices α alors que le domaine IV est composé d'un feuillet β de type «jelly roll» ou «gâteau roulé» (Danthi et al., 2010). Mentionnons également qu'outre sigma3, mu1 interagit avec les protéines lambda2 et sigma2.

1.5.3.2 Rôle dans la décapsidation et l'entrée cellulaire

Lors de la décapsidation virale, mu1 subit plusieurs clivages (**Fig. 5A.**). Ces produits de clivage de mu1 ont diverses fonctions. Tout d'abord, un clivage autocatalytique entre les résidus 42 et 43 de mu1 conduit à la formation de mu1-N et mu1-C (Pett et al., 1973). Notons que lors de la migration de virions sur gel de type SDS-PAGE, ce clivage est déjà effectué suite au protocole classique de préparation des échantillons. Ainsi, on ne voit jamais le mu1 complet, mais bien mu1C seulement (Coombs, 2008; Smith et al., 1969). Sur la partie N-terminale, il y a addition d'un myristoyl (acide gras saturé C₁₄). Cette portion de mu1 a une taille de 4.2 kda et permet la formation de pores dans l'endosome d'une taille variant entre 4 à 10 nm (Agosto et al., 2006; Zhang et al., 2009). Ceci faciliterait ainsi l'entrée de la particule dans le cytoplasme. L'autre partie, mu1C, faisant 72 kda, subit d'autres clivages par des protéases cellulaires, la trypsine ou encore la chymotrypsine. Ce clivage s'effectue au niveau des résidus 581-582 pour la chymotrypsine et aux résidus 584-585 pour la trypsine (Schiff, 1998). Un fragment de 59 kda nommé delta (δ) et un plus petit de 13 kda nommé phi (ϕ) sont produits (**Fig. 5B.**). Ces différentes régions de la partie C-terminale (delta et phi) sont impliquées dans l'activation de l'apoptose, la pénétration membranaire et la formation de

pores (**Fig. 5C.**) (Agosto et al., 2006; Danthi et al., 2010; Ivanovic et al., 2008; Sarkar and Danthi, 2010; Zhang et al., 2009). Notons que la partie delta est relâchée grâce à la protéine chaperonne Hsc70 durant l'entrée dans le cytoplasme de la cellule infectée (Ivanovic et al., 2007).

Les ISVPs ont la capacité d'altérer l'intégrité de la membrane cellulaire. Ils sont capables de lyser les érythrocytes alors que les virions et les cores en sont incapables (Chandran and Nibert, 1998). La transformation d'ISVPs à ISVPs* entraîne dans l'ordre, une sensibilité plus importante de $\mu 1$ envers les protéases, la relâche du fragment autocatalytique ($\mu 1N$), la relâche de $\sigma 1$, l'activation de la transcription et finalement, la perte d'infectivité (Chandran et al., 2002; Danthi et al., 2010; Middleton et al., 2007; Odegard et al., 2004).

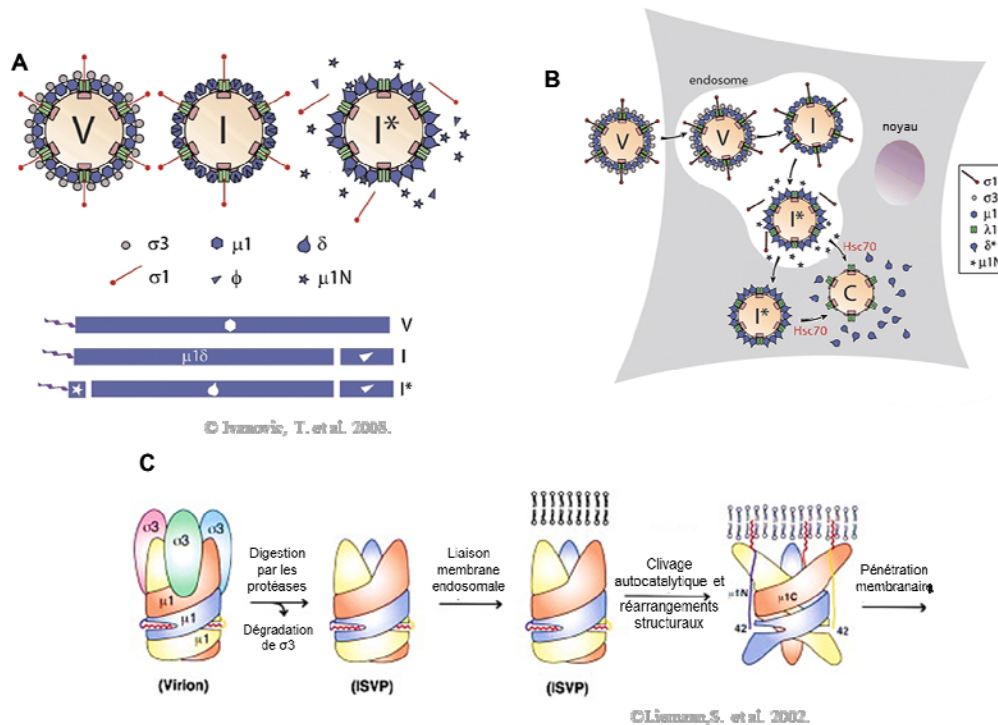


Fig. 5. Changements conformationnels sur les protéines de la capsid externe, sigma3 et mu1 lors de la décapsulation et l'entrée.

A) Formes virion (V), ISVP (I) et ISVP* (I*) et patrons de clivage de la protéine mu1 impliqués. B) Vue d'ensemble des mécanismes de décapsulation et d'entrée endosomale et protéines impliquées. C) Schématisation des réarrangements structuraux du complexe formé par les protéines sigma3 et mu1 lors de la décapsulation et l'entrée. Adaptée de (Ivanovic et al., 2007, 2008; Zhang et al., 2006)

Des expériences de résistance à la chaleur et à l'éthanol sur des ISVPs ont été reliées avec des défauts d'entrée du virus dû à des mutations surstabilisantes de la région delta de mu1 (résidus D371, Y431, K459), conférant à ces mutants l'incapacité d'effectuer la transformation d'ISVP en ISVP* correctement (Chandran et al., 2003; Danthi et al., 2008a; Middleton et al., 2002, 2007; Wessner and Fields, 1993). Ces mutations se retrouvaient dans les domaines III et IV de mu1 (feuillet β de type jelly-roll) et c'est précisément à ces endroits que s'effectuent les contacts entre les monomères de mu1 et aussi entre les trimères de mu1, expliquant les effets sur la stabilité de mu1. La morphologie de plages de lyse était même altérée, celles-ci étaient plus petites que celles

du virus de type sauvage. De plus, leur capacité à lyser les globules rouges était réduite (Agosto et al., 2007). Des chercheurs ont poussé plus loin ces observations et ont réussi à sélectionner des révertants de ces mutants thermostabilisants, c'est-à-dire des mutants thermolabilisants. Ces derniers restauraient le défaut d'entrée chez les mutants originaux (résidus E89 et A184) (Agosto et al., 2007).

1.5.3.3 Fonction apoptotique de mu1

Tel que mentionné précédemment, l'induction de l'apoptose est un phénomène observé chez réovirus. Certaines protéines ont été identifiées comme étant des responsables majeurs, dont sigma1 et mu1 (Danthi et al., 2006, 2008a; Tyler et al., 1996). Des études subséquentes sont parvenues à démontrer que les fragments relâchés de mu1, tel le fragment mu1-phi et delta, auraient la capacité d'activer un des facteurs de transcription clé de l'apoptose, le « Nuclear Factor kappa B » (NF- κ B) (Danthi et al., 2008b; King et al., 2012). Le fragment delta aurait également la capacité d'activer le « Interferon Regulatory Factor 3 » (IRF3) (Connolly et al., 2000; Danthi et al., 2010; Hansberger et al., 2007; Holm et al., 2007). Étonnamment, ce sont les mutants d'entrée ou de conversion d'ISVP à ISVP* présents sur les régions delta et phi (ex : résidus A319E, V425F, Q440L, I442V, K594D, I595K) qui ont permis de faire cette découverte. L'entrée virale efficace et l'activation de l'apoptose seraient donc des phénomènes reliés (Danthi et al., 2008a). Par contre, les chercheurs ont dû rectifier cette dernière affirmation puisqu'un de leurs mutants (I595K) possède un défaut dans l'activation de l'apoptose sans avoir de contraintes au niveau de l'entrée. Ceci signifiait donc qu'une pénétration membranaire efficace est un prérequis pour une activation de l'apoptose (Danthi et al., 2008b). *In vivo*, les phénomènes observés chez les mutants d'entrée de mu1- δ et ϕ seraient corrélés avec une diminution de la virulence chez des souris inoculées de façon intracrânienne (Danthi et al., 2008a, 2008b).

D'autres recherches ont démontré que mu1 induisait l'apoptose en activant les voies de signalisation extrinsèques et intrinsèques par les caspases 8 et 9 ainsi que la caspase 3 située en aval. Les deux voies étaient nécessaires pour induire l'apoptose par mu1. De plus, la relâche caractéristique du cytochrome c et de smac/DIABLO de la

mitochondrie était également observée, mais ce, indépendamment des protéines proapoptotiques de la famille Bcl-2 (Bax et Bak) (Kominsky et al., 2002a, 2002b; Wisniewski et al., 2011). Il a ensuite été démontré que ce sont les résidus K594D et I595K de mu1-phi qui déstabilisent et perméabilisent la membrane cellulaire et mitochondriale, causant la relâche de petites molécules activatrices de l'apoptose (Kim et al., 2011a).

1.5.4 Lambda2

1.5.4.1 Structure et localisation

La protéine lambda2 (144 kDa) est organisée en 60 pentamères au sein du virion. Elle interagit avec chacune des cinq autres protéines structurales (λ 1, σ 2, σ 1, σ 3, μ 1) (Dermody et al., 2013). Fortement impliquée dans l'assemblage de la capsid externe, lambda2 permet l'ancrage de la protéine de fixation sigma1 (Hazelton and Coombs, 1999). C'est la protéine du core la plus variable entre les sérotypes (92% d'homologie entre T1L et T3D) (Coombs, 2008). Après la décapsidation et l'entrée dans la cellule, lambda2 subit un changement de conformation qui entraîne l'ouverture du tunnel formé par la structure pentamérique et ainsi l'activation de la transcription. L'hypothèse veut que ce soit via ce tunnel que l'ARN viral transite hors du core (Coombs, 2008). Dans un autre ordre d'idée, une étude évoque sommairement le rôle de lambda2 dans la sensibilité à l'IFN dans des cellules de myocarde (Sherry et al., 1998).

1.5.4.2 Une enzyme importante

La fonction principale de lambda2 est enzymatique. En effet, elle met en place la coiffe en 5' des ARNm viraux nouvellement synthétisés (Coombs, 2008). Cette coiffe est constituée de 7-méthylguanosine liés en 5'-5' aux trois groupes phosphates qui eux sont liés au 2'-O-méthyl guanosine du brin d'ARN positif ($m^7GpppG^{m2'OH}$) (Furuichi et al., 1976). Lambda2 est à la fois guanylyltransférase, méthyltransférase 1 et méthyltransférase 2. Son domaine N-terminal possède l'activité guanylyltransférase (résidu Lys 190) où le GMP, lié de façon covalente avec lambda2, est transféré au 5' diphosphate des ARNm

viraux (Luongo, 2002; Luongo et al., 2000). En ce qui concerne les fonctions de méthyltransférase, les régions concernées (résidus 434 à 691 et 804 à 1022) possèdent la structure caractéristique des nombreuses méthyltransférases connues (Bujnicki and Rychlewski, 2001). En effet, on y retrouve sept feuillets β de polarité mixtes au sein du site de fixation du SAM (S-adenosyl methionine) (Dermody et al., 2013; Nibert et al., 1996). Le SAM sert de donneur de méthyl qui est transféré à l'ARN (Furuichi et al., 1976). La région de fixation des nucléotides est localisée à la lysine 226 (Fausnaugh and Shatkin, 1990). Néanmoins, d'autres évidences suggèrent que les sites autrefois considérés comme méthyltransférase 1 et 2 devraient être interchangés étant donné la présence de domaines fonctionnels caractéristiques (Bujnicki and Rychlewski, 2001).

2 L'activité oncolytique

À la fin des années 90, des chercheurs ont remarqué que réovirus se répliquait et détruisait préférentiellement les cellules cancéreuses, plus spécifiquement les cellules transformées par l'oncogène Ras (King et al., 2012). Les raisons possibles pouvant expliquer cette activité oncolytique sont nombreuses, mais notre compréhension demeure incomplète et nous tenterons d'étayer les principales raisons. En plus de réovirus, plusieurs autres virus sont également à l'étude en tant que virus oncolytique et font l'objet d'essais cliniques nombreux et variés chez l'humain. Faisons tout d'abord un survol des principaux virus oncolytiques en général pour ensuite se concentrer sur le cas de réovirus. L'article de vulgarisation paru en 2014 (voir Annexe 2) résume sommairement ce sujet (Sandekian and Lemay, 2014).

2.1 Généralités sur les cancers et les virus oncolytiques

Selon les dernières statistiques canadiennes, le cancer est la principale cause de décès au pays. On estime que 2 Canadiens sur 5 en seront atteints au cours de leur vie et que 1 sur 4 y succombera (Société canadienne du cancer, 2014). Les thérapies conventionnelles contre le cancer, soit la chimiothérapie et la radiothérapie, quoique parfois très efficaces, nécessitent encore aujourd'hui certains perfectionnements. En effet, ces thérapies ne sont pas toujours spécifiques envers les cellules cancéreuses, ce qui cause de nombreux effets secondaires indésirables pour le patient, en plus du fait que certains cancers sont résistants à ces traitements. D'autres types de thérapies, combinées ou non avec les thérapies conventionnelles, seront sans doute développées afin d'éliminer le cancer chez de nombreux patients. Les virus oncolytiques pourraient s'ajouter à l'arsenal thérapeutique contre le cancer prochainement. Les raisons sont nombreuses et nous tenterons d'expliquer les principales.

Les virus exploitent, par définition, la machinerie cellulaire à leur avantage pour se répliquer et ultimement détruire la cellule. Les cellules ont cependant développé plusieurs mécanismes afin de limiter la réplication virale (ex. : l'apoptose, la réponse à l'IFN,

l'inhibition de la synthèse protéique, etc.). Cependant, les cellules cancéreuses sont spécialement intéressantes pour la réplication virale puisque celles-ci sont dépourvues de plusieurs mécanismes qui restreignent normalement cette réplication. En effet, celles-ci ont éliminé ou inactivé plusieurs mécanismes de contrôle de la croissance cellulaire, de la mort cellulaire ainsi que les mécanismes de résistance aux infections (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011; Russell et al., 2012; Stojdl et al., 2000). Ainsi, l'apoptose, la détection immune, l'inhibition de la synthèse protéique sont toutes des réponses abolies, défectueuses ou incontrôlées chez les cellules cancéreuses. Les virus peuvent donc en tirer avantage pour se répliquer et détruire celles-ci, pour ensuite répéter le processus dans les cellules cancéreuses avoisinantes (Auer and Bell, 2012; Russell et al., 2012).

2.2 Types de virus oncolytiques

Ces dernières années, on remarque un intérêt de plus en plus marqué envers ce nouveau type de traitement. Ainsi, plusieurs chercheurs tentent d'optimiser le potentiel oncolytique de nombreux virus. Certains virus étudiés ont une capacité naturelle à détruire les cellules cancéreuses. C'est le cas du réovirus, du virus Newcastle, du virus des oreillons et du parvovirus H-1. Les virus modifiés sont des virus altérés génétiquement, les rendant atténués afin d'être sécuritaires. On peut aussi parfois ajouter des gènes additionnels maximisant ainsi leur potentiel oncolytique. On y retrouve le virus de la rougeole, l'adénovirus, le virus de la stomatite vésiculaire (VSV), le virus de la vaccine (VV) ainsi que le virus herpès simplex (VHS) pour ne nommer que ceux-là (Russell et al., 2012). Les tumeurs solides sont en général plus susceptibles aux virus oncolytiques, car ces derniers sont administrés directement de façon intratumorale. Les tumeurs systémiques sont parfois plus difficiles d'accès pour les virus oncolytiques puisqu'ils doivent se répliquer et pouvoir être efficacement disséminés. Par exemple, le système immunitaire peut reconnaître et neutraliser ces virus, ou encore, certains organes comme le foie ou les reins peuvent les séquestrer. Néanmoins, plusieurs recherches et avenues possibles sont en cours afin de contourner ces problèmes (Ferguson et al., 2012).

Les avantages d'utiliser ce type de thérapie pour traiter des cancers sont nombreux. On peut penser à la capacité des virus à s'autorenouveler, à leur spécificité envers un type cellulaire particulier (ou un récepteur cellulaire) ainsi qu'à leur lyse cellulaire. Cette dernière est d'autant plus importante qu'elle peut permettre une meilleure exposition d'antigènes tumoraux normalement dissimulés, favoriser l'accès au site de la tumeur, ou encore recruter le système immunitaire au site d'infection et donc au site de la tumeur (Gujar and Lee, 2014; Russell et al., 2012; Sze et al., 2013). Les chercheurs estiment qu'il y aurait deux modes d'action des virus oncolytiques sur les cellules tumorales, soit la lyse directe (par les virus), ou la destruction indirecte (recrutement de cellules T tumeurs-spécifiques). Cette dernière voie semble très importante, voire principalement responsable de l'efficacité de l'oncolyse virale (Gujar and Lee, 2014).

Ici, nous discuterons brièvement de quelques virus oncolytiques parmi les plus étudiés.

2.2.1 Le virus de l'herpès simplex

Le VHS est le virus causant principalement les feux sauvages. Suite à l'infection lytique, il établit une latence au niveau neuronal et peut se réactiver pour redevenir lytique lors de divers épisodes de stress ou d'immunosuppression (Alemany, 2013; Mullen and Tanabe, 2002).

La version oncolytique de ce virus possède une délétion sur le gène codant pour la protéine $\gamma 34.5$, responsable de la neurovirulence. De plus, cette délétion permet la réplication préférentielle dans les cellules en division telle que les cellules cancéreuses (Alemany, 2013; Guo et al., 2008; Mullen and Tanabe, 2002).

Le talimogène laherparepvec (virus oncolytique de l'herpès en combinaison avec le GM-CSF « Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor ») est actuellement étudié chez la compagnie Amgen Inc en Californie et est probablement le virus pour lequel les études cliniques sont les plus avancées (Vacchelli et al., 2013). Certains chercheurs estiment qu'il devrait être le premier virus oncolytique à être approuvé par

la FDA (« Food and Drug Administration ») aux États-Unis puisque plusieurs essais cliniques de phase 3 sur les mélanomes sont presque terminés et sont encourageants (Bell, 2010; Russell et al., 2012; Vacchelli et al., 2013). Suite à une administration intratumorale, les chercheurs ont observé chez 8 des 50 patients atteints de mélanomes malins métastatiques, une régression complète des tumeurs qui ont subi ou non une injection (Senzer et al., 2009; Vacchelli et al., 2013). Ceci a permis de démontrer la capacité du virus à solliciter le système immunitaire au sein des tumeurs plus ou moins rapprochées du site d'injection (Russell et al., 2012).

Des études plus récentes ont malheureusement été légèrement moins spectaculaires que prévu en ce qui concerne le taux de survie, lorsque comparées avec l'administration de GM-CSF seul. Même si la tendance penchait fortement pour le virus oncolytique ($p=0.051$) cela pourrait malheureusement affecter l'approbation de la thérapie (The Pharma Letter, 2014). Amgen a récemment soumis sa demande à la EMA (European Medicine Agency) afin d'obtenir leur approbation comme traitement contre les mélanomes (Amgen Inc., 2014).

2.2.2 Le virus de la vaccine

Le VV fait partie de la famille des Poxviridae. C'est une souche de VV qui fut utilisée pour la vaccination contre la variole. Ce n'est qu'en 1922 qu'on a remarqué sa capacité à faire régresser des tumeurs chez les souris et chez les rats (Guo et al., 2008). Ce virus possède plusieurs attributs qui font de lui un bon virus oncolytique. La lyse cellulaire est très rapide (cycle viral d'environ 8 h) et ils peuvent supporter de grandes quantités d'ADN additionnel. On note également deux gènes importants pour son potentiel oncolytique : TK et VGF (Dave et al., 2014). La thymidine kinase (TK) est impliquée dans la synthèse des nucléotides. Dans les cellules normales, la quantité de nucléotides est faible et le gène TK est essentiel à la réplication virale. Cependant, dans les cellules cancéreuses, de grandes quantités de nucléotides sont présentes et le gène TK n'est plus nécessaire. En supprimant le gène TK, on restreint donc la réplication dans des cellules ayant de forts taux de nucléotides, soit les cellules cancéreuses (Guse et al., 2011). VGF est quant à lui un homologue du facteur de croissance EGF (epidermal

growth factor), il peut donc se lier au récepteur EGFR de la cellule, ce qui ira stimuler la production virale (Buller et al., 1988). Un autre avantage d'utiliser ce virus est le fait que lors de la lyse cellulaire, le virus acquiert son enveloppe via la membrane cellulaire et intègre certaines protéines cellulaires (CD46, CD55, CD59, CD71, CD81 et le CMH-1) qui empêcheraient ainsi la reconnaissance et la neutralisation de celui-ci par le complément (Dave et al., 2014; Vanderplasschen et al., 1998). Des études cliniques ont également démontré que le VV serait en mesure d'infecter les cellules associées aux tumeurs, permettant alors l'altération vasculaire de la tumeur et de son microenvironnement. Ceci aurait pour conséquence une meilleure accessibilité au site tumoral pour les cellules du système immunitaire.

Le VV oncolytique est actuellement en essais cliniques chez la compagnie Jennerex basée à San Francisco. Tout comme VHS, on lui a ajouté le GM-CSF (souche nommée JX-594) et suite à une administration intratumorale chez des patients ayant des carcinomes hépatocellulaires, une régression a été observée chez 3 des 10 patients (Park et al., 2008; Vacchelli et al., 2013). On a également observé la régression de tumeurs non injectées, démontrant encore l'efficacité de cette approche. Le GM-CSF recrute les cellules NK et les cellules dendritiques dans l'environnement tumoral ce qui engendrerait une « tempête inflammatoire » où plusieurs cytokines seraient relâchées et où la réponse antitumorale serait très sollicitée (Dave et al., 2014).

2.2.3 Le virus de la stomatite vésiculaire

Le VSV est un rhabdovirus très sensible à l'IFN- α . Plusieurs propriétés font de lui un bon virus oncolytique : une bonne connaissance de sa biologie, un génome restreint et facilement manipulable, une indépendance relative aux récepteurs et une absence d'une immunité préexistante chez l'Humain (Hastie and Grdzlishvili, 2012). Des groupes de recherche ont modifié différents gènes lui donnant sa forme oncolytique. Ici, nous nous concentrerons sur la modification la plus commune, soit la mutation sur la protéine codant pour la matrice (M). En plus de son rôle structural, cette protéine est responsable de l'inhibition de la transcription d'ARN cellulaires (Sinkovics and Horvath, 2008). Cela assure sa sécurité puisque la réplication virale est très sensible à l'IFN et donc seules les

cellules cancéreuses seraient lysées. La mutation sur cette protéine est nommée $\Delta M51$ (délétion d'une méthionine au résidu 51) et a démontré la réduction tumorale de tumeurs humaines de gliomes malins suite à des xénogreffes sur des souris nues (Lun et al., 2006). Cette mutation permet de libérer l'export d'ARNm et restaure la transcription, la traduction et la sécrétion de protéines telles que l'IFN de type I (Janelle et al., 2013; Stojdl et al., 2003).

De plus, des chercheurs ont démontré que l'utilisation de rapamycine avec ce virus mutant augmentait la survie des rats immunocompétents ayant des gliomes malins. La rapamycine, ciblant mTOR (mammalian target of rapamycin), inhibe donc la production d'IFN de type I et augmente l'oncolyse par VSV $\Delta M51$ (Alain et al., 2010).

2.2.4 L'adénovirus

L'adénovirus ne cause normalement pas de pathologies très graves chez l'humain. Il est principalement responsable d'infections respiratoires et d'infection oculaires mineures (Alemany, 2013). C'est le premier virus oncolytique modifié génétiquement utilisé en essai clinique chez les humains (Bischoff et al., 1996; Huebner et al., 1956; Tedcastle et al., 2012). Ce virus, dénommé ONYX-015, possède une délétion au niveau du gène E1B-55K (Guo et al., 2008; Tedcastle et al., 2012). L'inactivation d'E1B-55K permet la réplication de ce virus seulement dans des cellules déficientes pour p53. Cette dernière est une protéine largement étudiée en tant que « gène suppresseur de tumeur »; elle est responsable de nombreuses fonctions de réparation de dommages à l'ADN et est fréquemment défectueuse chez les cellules cancéreuses (Hanahan and Weinberg, 2011; Speidel, 2015). Toutefois, il a été subséquentement démontré que c'est la fonction de transport d'ARNm de E1B-55K qui serait responsable de cette spécificité du virus. Malheureusement, les résultats d'essais cliniques à plus grande échelle ont été décevants, car peu d'effets thérapeutiques significatifs ont été démontrés (Guo et al., 2008).

Par contre, le virus H101 (délétion dans E1B-55K et délétion partielle dans E3) a montré de meilleurs effets (Tedcastle et al., 2012). C'est le seul virus oncolytique au monde à être approuvé comme traitement contre le cancer et est produit par Shanghai

Sunway Biotech. En effet, le gouvernement chinois a approuvé l'emploi de ce virus pour le traitement des carcinomes de type tête-cou en 2005 (Garber, 2006; Maitra et al., 2012).

2.3 Obstacles à l'utilisation des virus oncolytiques

Malgré des résultats encourageants, les virus oncolytiques rencontrent de nombreux obstacles au cours d'un traitement. Ce sont la spécificité, l'efficacité, la propagation ainsi que le transport au sein de la tumeur. En effet, certains virus peuvent adhérer à l'endothélium qui constitue la paroi des vaisseaux sanguins, d'autres peuvent être neutralisés par le complément ou des anticorps, certains sont carrément éliminés par les lymphocytes ou encore par des organes tels que le foie et les reins. Tout ceci sans compter le fait que les tumeurs sont généralement faiblement vascularisées et donc difficilement atteignables par les virus (Russell et al., 2012; Sze et al., 2013; Tedcastle et al., 2012; Vacchelli et al., 2013). Au niveau immunitaire, les tumeurs sont également capables de sécréter des cytokines immunosuppressives (TGF β , VEGF, IL-10, etc.) qui altèrent la réponse immune. Certaines tumeurs sont aussi en mesure de diminuer l'expression du CMH-1 affectant négativement la présentation antigénique (Auer and Bell, 2012).

2.3.1 Inquiétudes au niveau de la sécurité et de l'éthique

Bien évidemment, l'administration de virus à des patients cancéreux soulève de nombreuses questions au point de vue de la sécurité. L'opinion publique ne serait probablement pas, de prime abord, très enthousiaste à l'idée qu'un patient atteint d'un cancer se fasse inoculer un virus (Harrington et al., 2010). Le film d'Hollywood « I am Legend » avec Will Smith, paru en 2007, a même illustré cette crainte qu'a le public envers les traitements de virothérapie. Dans le récit, des patients ayant été traités avec le virus oncolytique de la rougeole étaient devenus des morts-vivants... Ce scénario de science-fiction est bien évidemment tiré par les cheveux, mais il demeure que la sécurité du traitement est un élément primordial au succès de ce nouveau type de thérapie.

Précisons que plusieurs mesures de sécurité sont prises au cours des essais cliniques et divers comités et instances gouvernementales supervisent étroitement ces recherches. Rappelons que plusieurs virus étudiés sont soit présents de façon ubiquitaire dans l'environnement, soit atténués (comme c'est le cas des vaccins), ou alors ce sont des virus infectant d'autres mammifères que l'humain. Plusieurs études ont déjà complété la première phase qui consiste à examiner la toxicité de l'administration de divers virus. Dans la plupart des cas, peu ou pas d'effets secondaires importants ont été observés, et ce, même à des doses très élevées. La plupart des symptômes se résument à des fièvres, maux de tête, de la fatigue, de la douleur et parfois des dysfonctions hépatiques. On estime que cela s'apparente à une grippe. On conclut que la plupart des symptômes sont donc très tolérables comparativement aux effets secondaires engendrés par la chimiothérapie et la radiothérapie (nausée, diarrhée, perte de cheveux, anémie, infection, infertilité, etc.) (Lichty et al., 2011). À notre connaissance, notons également que la crainte que certains virus modifiés révertent afin de redevenir pathogéniques n'a pas encore été observée et aucun cas de transmission entre humains n'a pu être détecté jusqu'à présent (Liu et al., 2007; Russell et al., 2012). Néanmoins, il reste que plusieurs recherches sont en cours afin d'optimiser l'utilisation de la virothérapie contre le cancer.

2.4 Nouvelles stratégies prometteuses

Avec les avancées récentes en biologie moléculaire et en génétique, il devient plus simple de manipuler les virus afin d'avoir un traitement plus ciblé.

Des chercheurs étudient la possibilité d'utiliser les virus en tant que « Cheval de Troie ». Les virus pourraient transporter des composés toxiques ou mortels ciblant les cellules cancéreuses. Comme démontré précédemment, il est possible d'ajouter des gènes aux virus afin qu'ils soient en mesure d'exprimer des cytokines, telles que TNF α (Tumor Necrosis Factor) ou le GM-CSF. Ce faisant, lors de la lyse cellulaire par le virus, ces cytokines seront libérées et permettront le recrutement du système immunitaire au site de la tumeur (Sze et al., 2013; Tedcastle et al., 2012).

Une autre stratégie serait d'inhiber transitoirement le système immunitaire afin de permettre au virus d'atteindre la tumeur sans être neutralisé, et ensuite de stimuler le système immunitaire et de le recruter au site de la tumeur. Ceci maximiserait la propagation virale et l'immunité anti-cancer (Russell et al., 2012). La combinaison avec des immunosuppresseurs (cyclophosphamide) est intéressante puisqu'il a été démontré qu'ils peuvent réduire la neutralisation et maintenir la persistance virale afin de prolonger l'effet antitumoral (Chiocca, 2008).

Des études se concentrent également sur la capacité de détecter *in vivo* la réplication virale au sein de la tumeur. En modifiant le virus afin qu'il exprime un gène rapporteur, il serait possible d'obtenir des données de pharmacocinétique. Mentionnons le cas du gène codant pour le symporteur d'iode de sodium thyroïdien (NIS) qui a été inséré dans les génomes de plusieurs virus oncolytiques tels que l'adénovirus, la rougeole, le VSV, le VHS et le VV. Celui-ci a pour fonction de concentrer l'iode radioactif (Russell et al., 2012; Tedcastle et al., 2012). Lorsque ces virus oncolytiques sont administrés en combinaison avec l'iode radioactif, on observe, en plus de pouvoir détecter les sites de réplication des virus oncolytiques, qu'il y a un effet synergique entre la virothérapie et la radiothérapie. On parle alors de radiovirothérapie (Dingli et al., 2003, 2004).

L'ajout de séquences complémentaires à des microARN (miARN) est également largement étudié afin d'accroître la spécificité des virus oncolytiques (Russell et al., 2012). Puisque certaines tumeurs expriment des miARN différents des cellules normales, on peut, en ajoutant des séquences complémentaires à un miARN spécifique pour un tissu en particulier, parvenir à restreindre la réplication dans celui-ci (Farazi et al., 2013). Par exemple, l'ajout d'un miARN spécifique au foie élimine l'hépatotoxicité de l'adénovirus sans affecter sa capacité de détruire les cellules cancéreuses (Cawood et al., 2009, 2011; Leber et al., 2011).

Une autre avenue intéressante est l'étude de composés pharmacologiques capables de stimuler la réplication virale dans les cellules cancéreuses. Une étude a récemment identifié une molécule chimique nommée VSe1 (Virus-sensitizers 1) capable de cibler les

réponses immunes tumorales tout en augmentant l'efficacité de l'oncolyse chez un modèle animal (Diallo et al., 2010)

2.4.1.1 Une multitude de virus oncolytiques contre une multitude de cancers?

On observe également ces dernières années que le nombre de virus reconnus comme possédant des propriétés oncolytiques augmente. En plus de ceux déjà mentionnés dans le texte, on retrouve le virus de la maladie de Newcastle, le Cocksackie virus, Coronavirus, Influenza, Myxoma, virus de la forêt de Semliki, virus de la vallée de Seneca, virus Sindbis ainsi que le Maraba virus, etc. (Lichty et al., 2011; Stanford et al., 2010). Il est évident qu'un arsenal thérapeutique plus élaboré contribuerait probablement à mieux comprendre et à mieux traiter les différents types de cancers.

Plusieurs compagnies se consacrent aux essais cliniques sur les virus oncolytiques et plusieurs articles en font mention (Lichty et al., 2011; Russell et al., 2012; Sze et al., 2013; Vacchelli et al., 2013). Il est envisageable que, dans les prochaines années, un premier virus oncolytique soit approuvé par les instances gouvernementales au Canada, aux États-Unis ou en Europe. Par contre, il est de plus en plus probable qu'un seul virus ne pourra cibler tous les cancers. Il se peut que chaque cancer ait sa virothérapie de prédilection (Russell et al., 2012; Tedcastle et al., 2012).

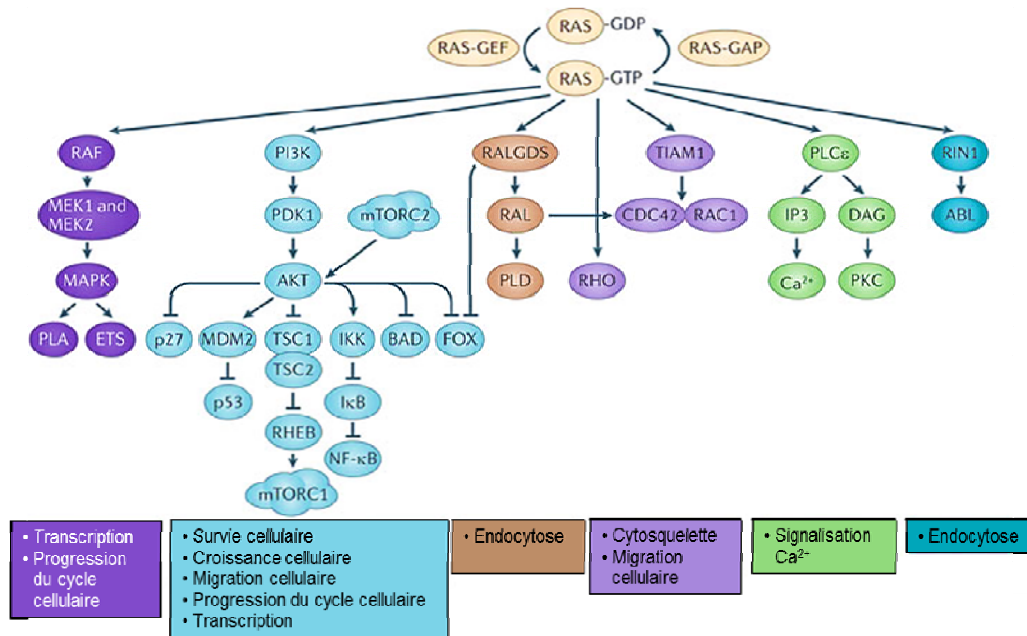
2.5 Le cas de réovirus

En 1998, des chercheurs canadiens ont remarqué la capacité du réovirus de type sauvage à se multiplier de préférence chez les cellules transformées par Ras, tout en les détruisant (Coffey et al., 1998). De plus, les cellules non transformées, ou normales, furent résistantes à l'infection du virus, élément important en ce qui concerne la sécurité du traitement potentiel (Duncan et al., 1978; Hashiro et al., 1977; Strong et al., 1998). Pour ces raisons, réovirus est actuellement à l'étude en tant que virus oncolytique pour le traitement de certains cancers. En effet, depuis 2003, la compagnie Oncolytics Biotech, qui est basée à Calgary, effectue des essais cliniques de phase II et III en administrant le Reolysin® qui s'avère être le réovirus de type sauvage (Oncolytics Biotech Inc., 2014)

chez des humains atteints de différents cancers. On dénombre 32 essais cliniques en cours ou déjà complétés (Gong and Mita, 2014)

2.5.1 L'oncogène Ras et son importance dans l'infection par réovirus

Ras est une protéine liant le GTP et est essentielle pour la régulation de plusieurs voies de signalisation dont la prolifération, la transformation et la différenciation. Cette protéine fut nommée suite à des études chez le sarcome du rat «*rat sarcoma*». Ras est régulé par des GEFs (guanine exchange factors) telle que *sos* et des protéines activatrices de GTPase telles que NF1 (necrosis factor 1). Ces deux protéines sont à la base du contrôle de l'état de Ras lié avec le GTP ou de GDP. Lorsque le GTP est lié sur Ras, celui-ci est activé et plusieurs cascades sont enclenchées régulant la transcription, la traduction, le transport, la progression du cycle cellulaire, la différenciation et l'apoptose. Notons que la mutation RasV12 contraint le GTP à être constitutivement lié à la protéine. Dans ce cas, Ras devient alors insensible au GDP et demeure constamment active. Des phénomènes comme la formation de métastases, l'angiogenèse et la perte du contrôle de croissance cellulaire sont liés à cette mutation sur la protéine Ras. Ras est donc un inducteur important de la transformation cellulaire, et ce, par le biais de ses nombreux effecteurs situés en aval. Les principaux sont la voie Raf, la voie PI3-kinases et la voie Ral/GEF (**Fig. 6**). La voie Raf fait intervenir les protéines MEK1/2, qui à leur tour activent p42, p44 et Erk1/2 impliquées dans la prolifération, la transcription et l'apoptose. La voie PI3K exerce sa fonction sur la prolifération, la survie cellulaire, la régulation du cycle cellulaire et le métabolisme. PI3K recrute Akt qui ira activer NF- κ B qui joue un rôle central dans l'apoptose. La voie RalGEFs est responsable de la prolifération et de l'inhibition de la mort cellulaire. Ral se lie à Cdc42/Rac, la phospholipase D et à RIP1 (Da Pan et al., 2009; Pylayeva-Gupta et al., 2011).



© Berndt et al., 2011

Fig. 6. Ras et ses voies de signalisation et leurs implications au niveau cellulaire.

Adaptée de (Berndt et al., 2011).

On estime de 30 % à 40 % le nombre de cancers ayant la protéine Ras activée (Bos, 1989; Yap et al., 2008). Plus spécifiquement, la majorité des tumeurs malignes solides ainsi que 80 à 90 % des cancers de la prostate, 40 à 50 % des cancers colorectaux et 50 % des cancers de la thyroïde ont la voie de signalisation Ras activée (Dave et al., 2014).

2.5.1.1 Premières études liant Ras et réovirus

Les premières études concernant le potentiel oncolytique de réovirus se concentraient sur des modèles *in vitro* de cellules de souris. En effet, les cellules fibroblastiques de souris NIH-3T3 étaient résistantes à l'infection, alors que l'ajout de l'oncogène Ras (ou un autre oncogène de cette voie tel que EGFR ou v-erbB) au sein de ces cellules (NIH-Ras) permettait la réplication virale (Strong and Lee, 1996; Strong et al., 1993, 1998). Par la suite, des chercheurs ont démontré que c'est la

voie Ras/RalGEF/p38 et non les voies Raf et PI3-kinases qui dicte la permissivité de l'infection par réovirus (Norman et al., 2004)

Les raisons pour lesquelles le réovirus infecte et se multiplie de manière préférentielle chez ces cellules demeurent cependant incertaines. Une meilleure décapsidation ou une inhibition de la réponse antivirale dépendante de l'IFN et de PKR semblent être deux des principaux facteurs (Alain et al., 2007; Lemay et al., 2007).

2.5.2 L'interféron

Un des mécanismes importants restreignant normalement la réplication virale est l'IFN. Cette molécule antivirale, lorsque sécrétée par une cellule infectée, ira activer les cellules avoisinantes en se liant à son récepteur, ce qui entraînera une cascade de signalisation qui prévient la cellule qu'une infection est en cours. Cependant, il a été démontré que les cellules transformées par Ras, contrairement aux cellules normales, sont déficientes pour l'induction et la production d'IFN- β , ce qui stimulerait la réplication virale chez ces cellules par rapport aux cellules parentales (Shmulevitz et al., 2010).

Lors du cycle de réplication de divers virus, des intermédiaires d'ARNdb sont souvent engendrés. Cette conformation d'ARN n'est normalement pas retrouvée dans la cellule ainsi les TLR (toll-like receptors), RIG-I (retinoic acid-inductible gene-I) et MDA5 (melanoma differentiation-associated protein 5) permettront l'activation de NF- κ B (nuclear factor kappa light-chain enhancer of activated B cell) et de IRF-3 (interferon regulatory factor-3) (**Fig. 7**). Ceux-ci iront induire l'IFN de type I (IFN- α et IFN- β) qui stimulera à son tour l'expression des ISGs (interferon-stimulated genes) dont la protéine PKR (protéine kinase R). Notons que PKR, une sérine/thréonine kinase, peut elle-même se lier à l'ARNdb, ce qui enclenchera sa dimérisation, puis son autophosphorylation et donc son activation (Shmulevitz et al., 2005). Cela inhibera la traduction par la phosphorylation du résidu Ser51 de la sous-unité α d'eIF2 (eukaryotic initiation factor 2 α) et donc la réplication virale sera interrompue (Bischoff and Samuel, 1989; Clemens, 1997; Knowlton et al., 2012; Shmulevitz et al., 2010). En somme, on peut conclure que

les IFN de type I (IFN- α et IFN- β) sont responsables du blocage de la traduction des ARNm viraux via PKR et eIF2 α (Wiebe and Joklik, 1975).

L'IFN induit également une seconde réponse transcriptionnelle suite à l'activation du récepteur de l'IFN α/β (IFNAR). Une cascade de signalisation impliquant JAK/STAT et ISGF3 provoque la phosphorylation de STAT1, STAT2 (signal transducer and activator of transcription) ainsi qu'IRF-9. Ce dernier ciblera le noyau pour activer les ISGs tel qu'IRF-7 ce qui stimulera à son tour IRF-3, conduisant ainsi à une rétroaction positive et à l'enclenchement de la production accrue d'IFN (Chawla-Sarkar et al., 2003; Knowlton et al., 2012).

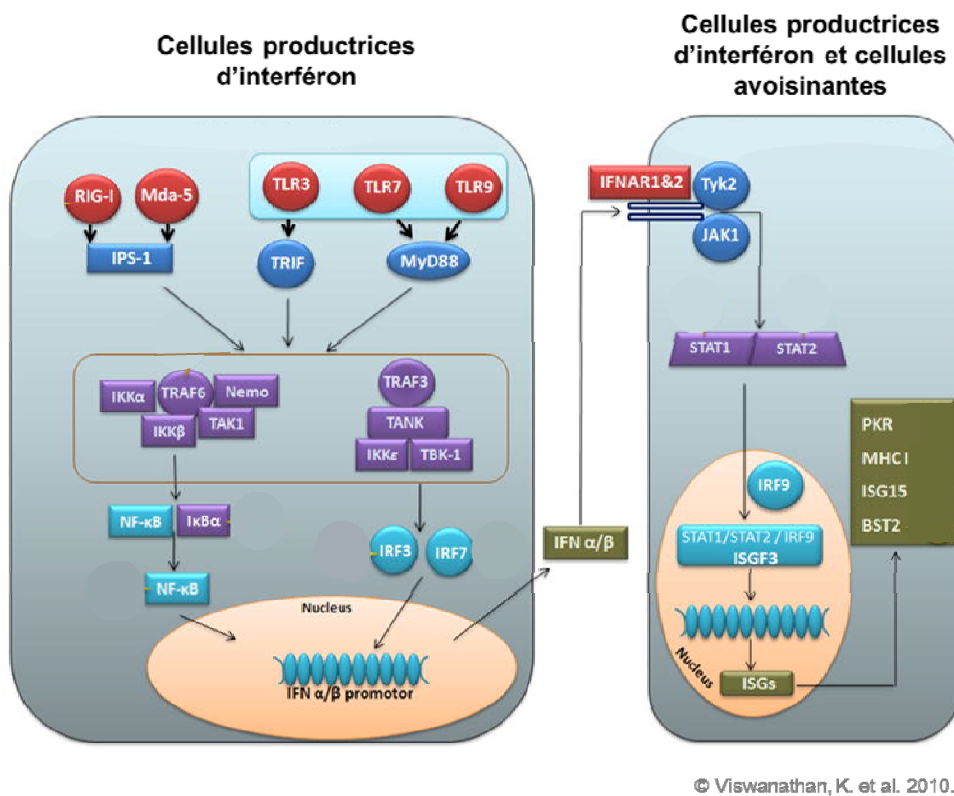


Fig. 7. Exemple de voies de signalisation de l'IFN stimulées suite à une infection virale et protéines cellulaires impliquées.

Adaptée de (Viswanathan et al., 2010)

2.5.2.1 Le rôle de Ras dans la signalisation de l'IFN

L'oncogène Ras inhibe l'activation de PKR, ce qui abolit la réponse à l'IFN et l'inhibition de la réplication virale (**Fig. 8.**) (Mullen and Tanabe, 2002; Sinkovics and Horvath, 2008). Les raisons pour lesquelles l'activation de Ras inhibe la phosphorylation de PKR ne sont pas claires encore aujourd'hui (Maitra et al., 2012; Mullen and Tanabe, 2002). Néanmoins, les études reliant l'inhibition de la réponse à l'IFN dans un contexte de Ras activé sont plus nombreuses. D'ailleurs, une étude de notre laboratoire a permis de corréler la sensibilité à l'IFN de réovirus et sa capacité à discriminer entre les cellules normales et les cellules transformées par Ras (Rudd and Lemay, 2005). Une étude subséquente a démontré que la voie Ras/MEK interrompt la signalisation de l'IFN- α via l'inhibition de STAT2 (Christian et al., 2009). Une étude plus récente a démontré que la transformation par Ras via la voie MEK/ERK stimulait la propagation de réovirus en inhibant la transcription d'IFN- β par l'entremise d'une régulation négative de la signalisation de RIG-1 (retinoic acid-inductible gene I) (Shmulevitz et al., 2010).

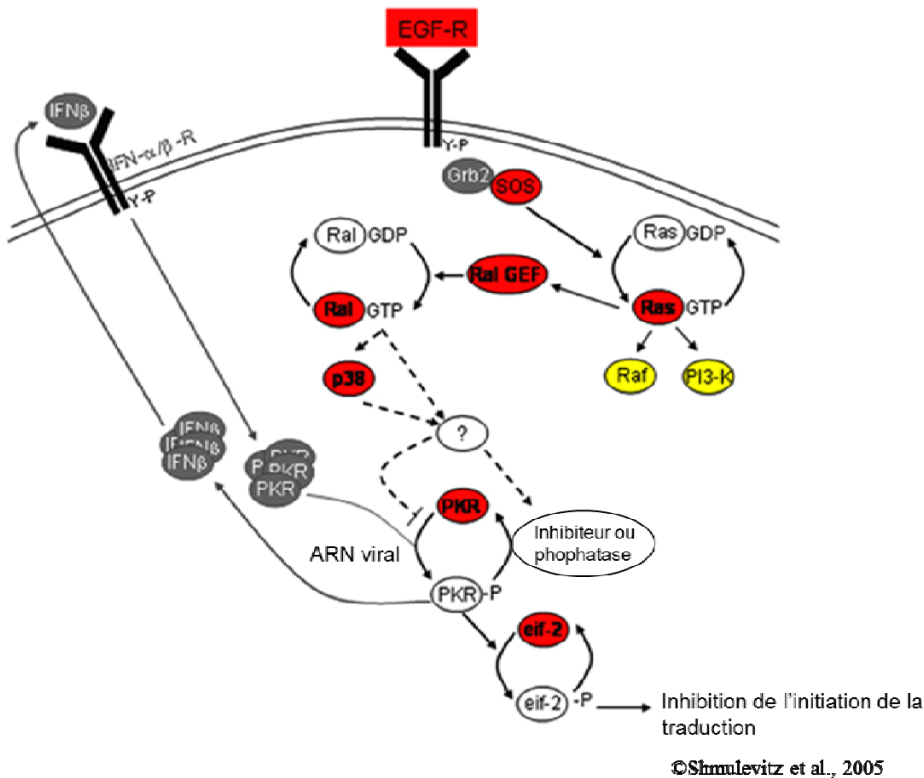


Fig. 8. Voies de signalisation impliquant Ras, PKR et l'interféron (IFN β) suite à une infection par réovirus.

Les protéines impliquées lors de l'infection par réovirus sont en rouge alors que celles en jaune ne seraient pas requises. Les lignes pointillées sont des voies proposées pour lesquelles les protéines intermédiaires sont encore inconnues. Adaptée de (Shmulevitz et al., 2005)

2.5.2.2 Facteurs viraux impliqués dans la signalisation de l'IFN

Chez réovirus, c'est le fragment d'ARNm du gène S1 qui serait le principal activateur de PKR (Bischoff and Samuel, 1989). La protéine sigma3, capable de lier l'ARNdb, peut par contre inhiber PKR (Bergeron et al., 1998; Imani and Jacobs, 1988; Lloyd and Shatkin, 1992; Sinkovics and Horvath, 2008; Strong et al., 1998). Cependant, cette résistance est incomplète puisque de hauts niveaux de PKR, tels qu'observés dans

les cellules normales, affectent négativement l'infection par réovirus (Rudd and Lemay, 2005). Les niveaux d'ARNdb et d'ARNm viraux peuvent aussi avoir un rôle à jouer dans ce phénomène (Sherry et al., 1998). Par contre, d'autres études indiquent qu'un certain niveau de PKR serait nécessaire à la réplication virale mais que ceci dépend du sérotype utilisé. Le T3D se répliquerait mieux dans des cellules MEF que dans des cellules MEF « knock-out » pour PKR. (Smith et al., 2005; Zhang and Samuel, 2007). Notons que ceci pourrait dépendre du type cellulaire utilisé. Il est possible qu'il y ait une certaine « fenêtre » d'activation de PKR nécessaire à la réplication maximale de réovirus.

L'induction d'IFN par réovirus a été associée aux protéines du core : mu2, sigma2 et lambda2 dans des cultures primaires de cellules de myocyte cardiaque et de fibroblastes (Sherry et al., 1998). Malgré le fait que les mécanismes impliquant sigma2 et lambda2 n'ont pas été élucidés, il a été rapporté que mu2 peut conduire à une accumulation anormale d'IRF9, ce qui inhiberait l'expression d'ISGs et, par le fait même, la production d'IFN. Notons que le sérotype 3 est plus sensible à l'IFN que le sérotype 1 (Imani and Jacobs, 1988). La protéine mu2 du sérotype T1L serait responsable de cette résistance. Elle réprimerait l'induction d'IFN contrairement au sérotype T3D, principalement dû à la nature de l'acide aminé présent au résidu 208. Cela affecterait l'interaction entre l'IRF9 et STAT2, ce qui conduirait à l'accumulation d'IRF9 au niveau du noyau et inhiberait la signalisation de l'IFN dans l'ensemble (Irvin et al., 2012; Sherry, 2009; Zurney et al., 2009).

2.5.3 La décapsidation de réovirus chez les cellules cancéreuses

Le microenvironnement tumoral est un aspect très intéressant pour l'oncolyse virale puisque ces composantes peuvent soit inhiber ou activer la réplication virale (De Silva et al., 2010). Les barrières telles que l'environnement anoxique et nécrotique, les vaisseaux sanguins restreints et la matrice extracellulaire dense peuvent effectivement empêcher le virus d'atteindre la cellule cancéreuse (Stanford et al., 2010). Pourtant, il été démontré que les cellules transformées par Ras sécrètent un niveau plus important de cathepsines B et L (Alain et al., 2007; Chambers et al., 1992; Collette et al., 2004; Urbanelli et al., 2010), ce qui favoriserait la décapsidation de réovirus.

Une étude a estimé que la transformation cellulaire par l'oncogène Ras stimulerait la production de réovirus infectieux en affectant plusieurs étapes de la réplication virale, dont la décapsidation. Celle-ci serait augmentée de 3 fois dans les cellules transformées comparativement aux cellules normales (Marcato et al., 2007).

2.5.3.1 Un lien entre la décapsidation et la réponse à l'interféron

Une étude récente a même relié la voie de l'IFN et la décapsidation de réovirus. Les protéines IFITM (interferon-inductible transmembrane protein), faisant partie de la famille des ISGs, ont préalablement été impliquées dans la restriction de l'entrée cellulaire de plusieurs virus enveloppés (Influenza, flavivirus, dengue, virus du Nil, etc.) (Brass et al., 2009; Huang et al., 2011; Jiang et al., 2010). Aussi, l'expression d'IFITM3 est augmentée de 4 à 40 fois par la signalisation des IFN de type I (Brass et al., 2009; Friedman et al., 1984; Lewin et al., 1991). Cette protéine inhiberait l'entrée de réovirus en se localisant dans les endosomes tardifs et en affectant soit la dégradation par des protéases des particules virales dans le lysosome ou en empêchant la pénétration membranaire des virus. Les ISVPs, la forme déjà décapsidée de réovirus, n'étaient pas affectées par la présence d'IFITM3 (Anafu et al., 2013).

2.5.4 Mécanismes de mort cellulaire induite par réovirus

2.5.4.1 L'apoptose

L'apoptose aurait un rôle important à jouer lors de l'oncolyse par réovirus, car elle serait 9 fois plus efficace dans les cellules transformées que dans les cellules normales (Marcato et al., 2007). Aussi, plusieurs types de cellules cancéreuses, telles que les cellules du cancer du sein et de la prostate, meurent par apoptose (Carew et al., 2013; Marcato et al., 2009). Cependant, il a aussi été rapporté que les cellules de gliomes malins sont susceptibles à l'apoptose induite par réovirus, sans qu'il y ait production virale (Wilcox et al., 2001).

In vitro, des chercheurs ont démontré que réovirus utilise les voies intrinsèques (mitochondriales) et extrinsèques de l'apoptose. La protéine TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) recrute FADD (Fas-associated death domain) qui recrute à son tour la caspase 8 qui ira activer les caspases 3 et 7. De plus, réovirus peut engendrer la relâche du cytochrome c et de Smac/DIABLO ce qui activera la caspase 9 et/ou les caspases 3 et 7 menant ainsi à l'apoptose. Notons que la caspase 8 peut également activer le cytochrome c et le Smac/DIABLO par l'entremise de Bid, Bax et Bak (**Fig. 9.**) (Clarke et al., 2000, 2001; Kominsky et al., 2002a, 2002b).

D'autres ont décrit une autre voie pour activer l'apoptose, soit la voie IRF-3 et NF- κ B. Cette voie augmenterait l'expression de Noxa (protéine proapoptotique de la famille Bcl-2), indépendamment de l'induction d'IFN- β (Gong and Mita, 2014; Knowlton et al., 2012). De plus, dans des cellules de myélomes multiples, l'apoptose était médiée par des épisodes de stress au niveau du réticulum endoplasmique, impliquant alors la relâche de calcium et l'induction de Noxa (Kelly et al., 2012).

2.5.4.2 La nécroptose et l'autophagie

Une nouvelle voie de mort cellulaire par réovirus a été identifiée en 2013, la nécroptose (Berger and Danthi, 2013). Selon la définition, la nécroptose est un phénomène se situant entre l'apoptose et la nécrose, où il y a activation de la mort cellulaire, mais indépendamment des caspases. On remarque également une diminution des niveaux d'ATP et la perméabilité membranaire est affectée due à l'activité kinase de RIP1 (receptor interacting protein 1). En effet, dans cette étude, les chercheurs ont remarqué qu'un blocage de la voie NF- κ B ou des caspases n'a pas affecté la capacité à réovirus d'induire la mort cellulaire. La protéine kinase RIP1 est effectivement impliquée dans ce phénomène et conduit à la perturbation de l'intégrité membranaire et stimulerait possiblement l'inflammation. On note également que chez réovirus, elle requiert la synthèse d'ARN viraux et de protéines virales, ce qui est différent de l'apoptose (Berger and Danthi, 2013).

D'autres chercheurs ont récemment décrit que réovirus pouvait moduler l'autophagie lors de l'oncolyse de myélomes multiples (Thirukkumaran et al., 2013). Sommairement, l'autophagie est impliquée dans la dégradation et le recyclage de protéines et d'organelles via le lysosome. Cette voie est également impliquée dans l'élimination de pathogènes intracellulaires (Chiu et al., 2014). Pour l'instant, on retrouve peu d'études se concentrant sur les mécanismes moléculaires de l'autophagie lors d'une infection par réovirus de mammifères. Une étude a cependant démontré que dans le cas des réovirus aviaires, l'autophagie était induite via PI3K/Akt/mTOR (Meng et al., 2012).

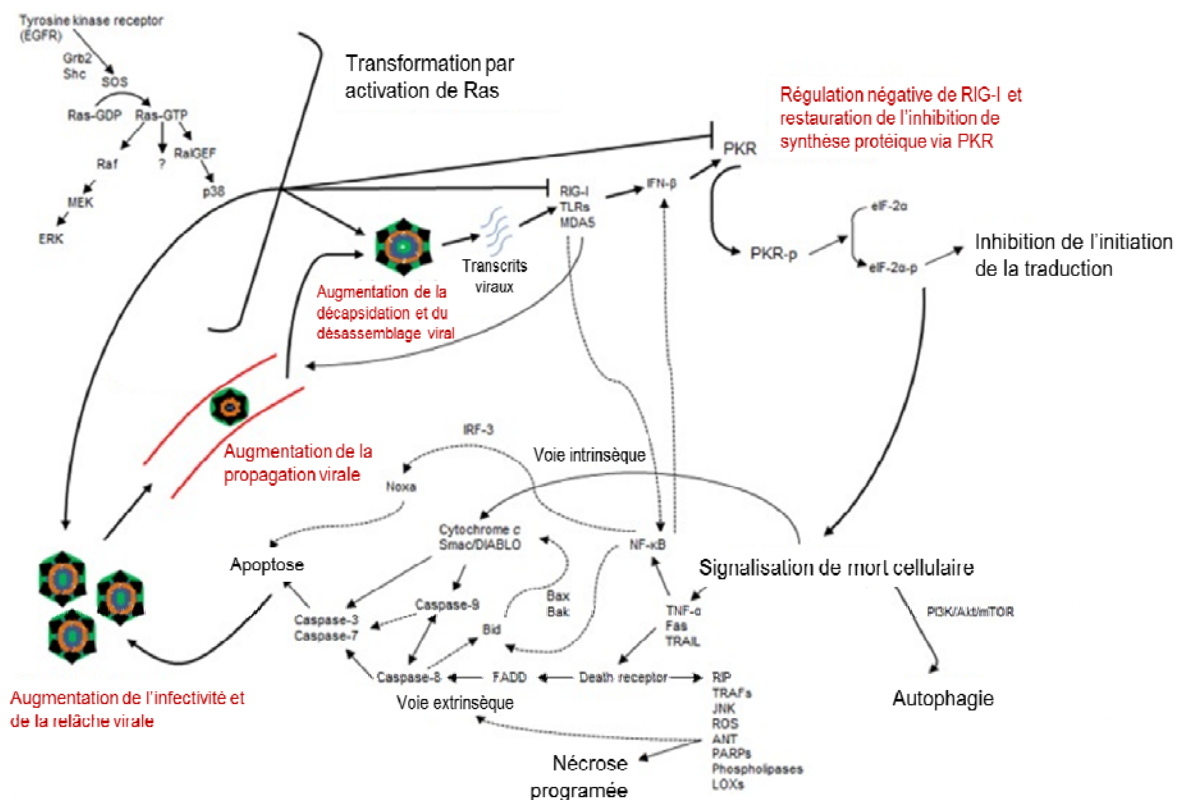


Fig. 9. Les composantes de réplication de réovirus qui sont favorisées dans les cellules transformées par l'oncogène Ras.

Les voies principales sont en rouge. Adaptée de (Gong and Mita, 2014).

2.5.5 Autres composantes importantes pour l'oncolyse de réovirus

Dans les cellules murines du cancer de la prostate, réovirus peut initier la production de cytokines pro-inflammatoires qui conduit à l'expression du CMH-1 sur les cellules tumorales. Ceci aide évidemment à la présentation d'antigènes associés aux tumeurs et ultimement à leur détection et leur destruction par diverses composantes du système immunitaire (Gujar et al., 2011).

Ces dernières années, des chercheurs ont découvert un nouvel oncogène qui favoriserait la réplication de réovirus (Lee et al., 2007; Park et al., 2010). Celui-ci se nomme CUG2 (cancer upregulated gene 2) et est surexprimé dans plusieurs types de cancers (ovaires, foie, poumon, pancréas, sein et gastro-intestinal). CUG2 inhibe l'expression de PKR, mais active Ras et p38 MAPK. Il y aurait une sorte de diapason entre Ras et PKR puisqu'une inhibition de Ras/p38 MAPK empêche la réplication de réovirus, et ce, même en présence de CUG2 (PKR inactive) (Park et al., 2010). Outre Ras et PKR, il y aurait donc d'autres facteurs qui seraient déterminants pour l'oncolyse par réovirus.

2.6 Essais cliniques avec Reolysin®

Le tiers des essais cliniques de virus oncolytiques en cours dans le monde se concentrent sur le réovirus T3D de type sauvage nommé Reolysin®. Ceux-ci sont effectués au Canada, aux États-Unis et au Royaume-Uni par la compagnie Oncolytics Biotech Inc., qui est basée à Calgary. L'administration du virus est souvent faite en combinaison avec un traitement thérapeutique anti-cancer conventionnel tel que la chimiothérapie. Plusieurs types de cancers sont ciblés : myélome multiple, carcinome du sein, mélanome, cancer du poumon, carcinome du pancréas, cancer de la prostate, tumeurs solides pédiatriques, etc. (Vacchelli et al., 2013).

Le plus souvent, on administre des doses intraveineuses de 3×10^{10} DICT₅₀ (dose infectieuse 50% en culture de tissus) de Reolysin® aux jours 1 et 5 pendant 60 minutes toutes les 3 ou 4 semaines. Il a été préalablement décrit que peu ou pas d'effets

secondaires majeurs sont observés dans les essais cliniques de phase I chez l'Humain. De plus, il ne semble pas y avoir de dose maximale toxique limite ou tolérée (Maitra et al., 2012). La plupart du temps, on note des symptômes s'apparentant à une grippe, une diarrhée ou une lymphopénie. Dans les essais de phase II, on a remarqué chez plusieurs patients une stabilisation ou une régression de la taille des tumeurs (Lee et al., 2014).

Des études de phase III avec Reolysin® en combinaison avec la chimiothérapie pour les patients atteints de carcinomes de la tête et du cou viennent tout juste de se terminer en avril 2014. Les résultats étaient plutôt encourageants puisqu'on y a observé une amélioration significative ($p=0.0072$) de survie, et ce, sans qu'il y ait progression tumorale chez les cancers localisés. De plus, ces données démontrent une légère tendance en ce qui concerne une régression tumorale ($p=0.076$). Chez les cancers ayant des métastases, les données ont moins de pouvoir statistique puisque plusieurs patients ont malheureusement succombé à la maladie. Néanmoins, il a été confirmé qu'il y avait régression des tumeurs dès la 6^e semaine du traitement ($p=0.021$) (Oncolytics Biotech Inc, 2014).

2.6.1 Limites possibles

Curieusement, malgré le fait que 90 % des carcinomes squameux provenant de la tête et du cou surexpriment EGFR, le mécanisme de l'oncolyse pour ce type de cancer n'est pas élucidé. En effet, ce n'est ni l'entrée, ni les niveaux d'expression de la voie EGFR ou Ras ni l'apoptose via le clivage de caspase 3, ni l'activation de PKR qui en sont responsables (Twigger et al., 2012). Il sera donc probablement plus difficile que prévu de prédire quel type de cancer pourrait être susceptible à l'oncolyse par réovirus puisqu'aucun biomarqueur n'existe à ce jour. Les auteurs rajoutent qu'il est possible que la réponse immune, activée grâce à la signalisation EGFR/Ras, soit importante pour expliquer l'oncolyse de ces cellules (Twigger et al., 2012).

La réponse immune est effectivement très sollicitée et très importante pour l'oncolyse de réovirus, car elle permet la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires qui recruteront le système immunitaire (Prestwich et al., 2009). Cependant, il s'avère que cela

est aussi un obstacle à la destruction de tumeurs puisque ces cellules immunitaires peuvent également reconnaître et interférer avec la réplication de réovirus avant qu'il ne puisse poursuivre son oncolyse (Lee et al., 2014). De plus, étant donné que le virus est ubiquitaire dans la population humaine, plusieurs individus ont déjà des anticorps neutralisants contre réovirus, ce qui pourrait potentiellement affecter le transport vers la tumeur lors d'administration par voie intraveineuse. Par contre, il a été démontré que le virus serait « protégé » en s'associant aux cellules du sang (PBMC « peripheral blood mononuclear cells »), tel que mentionné dans la section suivante.

Dans un autre ordre d'idée, il a été mentionné que l'expression du récepteur de réovirus, JAM-A, serait altérée ou encore que celui-ci pourrait être mal localisé chez certaines cellules cancéreuses intestinales, affectant la réplication de réovirus (van Houdt et al., 2008). La modification du tropisme par l'ajout d'une molécule à la protéine de fixation sigma1 serait une avenue intéressante, tel que mentionné dans la section 1.5.1.3.

2.6.2 Autres stratégies

Dans plusieurs essais cliniques, on utilise maintenant réovirus en combinaison avec la radiothérapie ou la chimiothérapie. Dans les deux cas, on a remarqué un effet synergique avec l'administration de réovirus *in vitro* et *in vivo* en ce qui concerne la diminution de la taille des tumeurs (Harrington et al., 2008; Kumar et al., 2008; Maitra et al., 2012). Cela s'explique possiblement dû au fait que certaines tumeurs deviennent résistantes aux thérapies conventionnelles, mais susceptibles à réovirus, ou encore que ces thérapies stimulent une réponse de stress qui augmente soit la signalisation de Ras ou soit l'apoptose. Finalement, il est possible que cela permette une meilleure accessibilité au site de la tumeur pour réovirus étant donné la forte pression interstitielle autour de la tumeur (Harrington et al., 2010).

D'ailleurs, il a été démontré qu'*in vitro*, certains agents de chimiothérapie peuvent également favoriser l'activation de l'apoptose et la dissémination de réovirus en stabilisant la protéine p53. Cette apoptose serait induite par la voie NF- κ B et p53-dépendante (Pan et al., 2011, 2013).

La perméabilité vasculaire est souvent affectée dans les cellules cancéreuses. Ce faisant, il est plus difficile pour les virus d'accéder à la tumeur. On peut contourner ce problème en administrant l'interleukine 2 (IL-2) afin d'augmenter la perméabilité vasculaire. Plusieurs composés de chimiothérapie et de facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire possèdent également cette propriété. Ainsi, dans le cas de réovirus, l'administration de VEGF165 a eu un effet synergique suite à l'injection de réovirus et l'efficacité antitumorale a été augmentée (Kottke et al., 2010; Russell et al., 2012).

Une nouvelle étude a démontré que réovirus pouvait infecter, se répliquer et tuer par apoptose des cellules hypoxiques du cancer de la prostate. Au niveau moléculaire, c'est la protéine HIF-1a (Hypoxia inductible factor 1a) qui est dégradée par le protéasome de façon ubiquitine-dépendante suite à l'infection par réovirus (Gupta-Saraf and Miller, 2014). Ce n'est cependant pas le cas pour tous les types cellulaires, puisque dans des cellules de glioblastomes humains, une infection par réovirus enclenche l'apoptose, mais stabilise HIF-1a (Figová et al., 2013)

Une autre stratégie serait d'utiliser les cellules dendritiques ou les cellules T comme transporteur de réovirus au sein de la tumeur. Ces cellules sont infectées par réovirus *ex vivo* et sont réintroduites chez le patient. Ce faisant, le virus est protégé de la neutralisation (Bell, 2012; Ilett et al., 2009, 2011). Les cellules dendritiques seraient plus efficaces pour transporter réovirus puisque celui-ci y serait internalisé, contrairement aux cellules T où le virus resterait accroché à la surface. De plus, la fonction et la maturation des cellules dendritiques ne sont pas affectées par la présence de réovirus (Ilett et al., 2011). Mentionnons que les virus de la rougeole et VSV peuvent également être transportés par les cellules T (Ong et al., 2007; Qiao et al., 2008; Russell et al., 2012). Notons que les transporteurs cellulaires ne doivent évidemment pas être susceptibles à la lyse par le virus oncolytique utilisé.

Une autre étude a cependant démontré que suite à l'administration intraveineuse de réovirus, celui-ci peut se retrouver séquestré par les granulocytes et les plaquettes. Ceci voudrait dire que réovirus peut se protéger naturellement des anticorps neutralisants en se

camouflant dans les cellules du sang (Adair et al., 2012; Dave et al., 2014). De plus, une étude récente a démontré que lors d'une infection intraveineuse par réovirus, les monocytes/macrophages murins CD11b⁺ séquestrent le virus et peuvent le transporter jusqu'au site tumoral. Les chercheurs ont par la suite réalisé qu'une préadministration de GM-CSF intraveineuse à la souris augmente davantage l'oncolyse par réovirus via la sécrétion de cytokines telles que le TNF- α induisant le recrutement de cellules NK et de macrophages. Étonnamment, la présence d'anticorps neutralisant a même favorisé ce phénomène et les auteurs suggèrent que cet aspect pourrait être exploité prochainement dans divers essais cliniques chez l'Humain (Ilett et al., 2014).

Certes, réovirus est un virus oncolytique très intéressant et se retrouve dans des phases très avancées d'essais cliniques. Plusieurs raisons peuvent expliquer la préférence de ce virus envers les cellules cancéreuses. Cependant, il reste que la base de cette activité oncolytique demeure incertaine et qu'une optimisation de ce potentiel oncolytique demeure souhaitable. Contrairement à d'autres virus comme le virus herpès, le virus de la vaccine ou l'adénovirus, réovirus n'était pas, jusqu'à tout récemment, facilement manipulable génétiquement. Ces nouvelles technologies permettront sûrement une meilleure compréhension de ce virus oncolytique et des mécanismes importants à l'oncolyse. Ceci ouvre également la porte à de nouvelles possibilités permettant de recourir à des virus modifiés génétiquement pour optimiser leur activité oncolytique. Ce sera le sujet de la prochaine section et du corps principal de cette thèse.

3 Approches pour modifier génétiquement réovirus

Réovirus est étudié depuis de nombreuses années et les techniques moléculaires ont évolué permettant une manipulation génétique de plus en plus concevable. Nous décrivons ici des méthodes dites « classiques » qui sont encore utilisées aujourd'hui. Puis, nous survolerons d'autres techniques plus avancées qui ont permis l'élaboration de la technique de génétique inverse qui est l'une des méthodes principales utilisés dans les travaux présents dans cette thèse.

3.1 La mutagenèse chimique

La mutagenèse chimique est classiquement utilisée afin de sélectionner des mutants résistants à divers agents chimiques. Ces virus mutants peuvent ensuite être étudiés afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués par exemple dans la réplication virale, la sensibilité à l'IFN, la décapsidation, l'entrée, etc. On peut par la suite, séquencer différents gènes du virus en question et ainsi relier un phénomène observé à une ou plusieurs mutations. Cette technique a été utilisée dans notre laboratoire pour la sélection d'un virus sensible à l'IFN. En effet, le réovirus de type sauvage a subi un traitement par mutagenèse chimique au NTG (nitrosoguanidine) et suite à des passages et des repiquages de clones, un virus hypersensible à l'IFN nommé P4L-12 a été sélectionné (Rudd and Lemay, 2005). Tel qu'expliqué dans la prochaine section 3.3, la mutagenèse chimique a également été utilisée dans la sélection de mutants thermosensibles (Fields and Joklik, 1969; Ikegami and Gomatos, 1968).

3.2 La persistance virale

La persistance virale est un autre moyen très documenté pour engendrer des mutations sur réovirus. L'établissement de la persistance virale en culture cellulaire peut être possible suite à une infection par des virus défectifs (virus propagés à plusieurs reprises à haute multiplicité d'infection). Selon le type cellulaire choisi, la majorité des cellules mourront, mais un faible pourcentage pourra survivre (**Fig. 10.**). S'ensuivent alors

des étapes de sélection et de coévolution virus-cellules. Les cellules demeurent infectées, mais elles ne meurent pas, et ce, grâce à des modifications génétiques qui permettent de limiter, par exemple, la production de cathepsines B et L, ce qui empêche la décapsidation virale. Dans cet exemple, on peut s'attendre à ce que le virus, de son côté, subisse lui aussi des mutations afin de se décapsider plus facilement et que sa réplication soit optimisée au sein de ces cellules.

La manière classique de déterminer si les cellules sont bel et bien en phase de persistance est de les réinfecter suite à un traitement avec des anticorps neutralisants. Les cellules dites guéries seront résistantes à une infection par un virus de type sauvage alors qu'elles seront lysées lors d'une infection avec le virus mutant ayant causé la persistance. (Baer and Dermody, 1997; Dermody et al., 1993; Golden et al., 2002; Middleton et al., 2007; Wetzel et al., 1997).

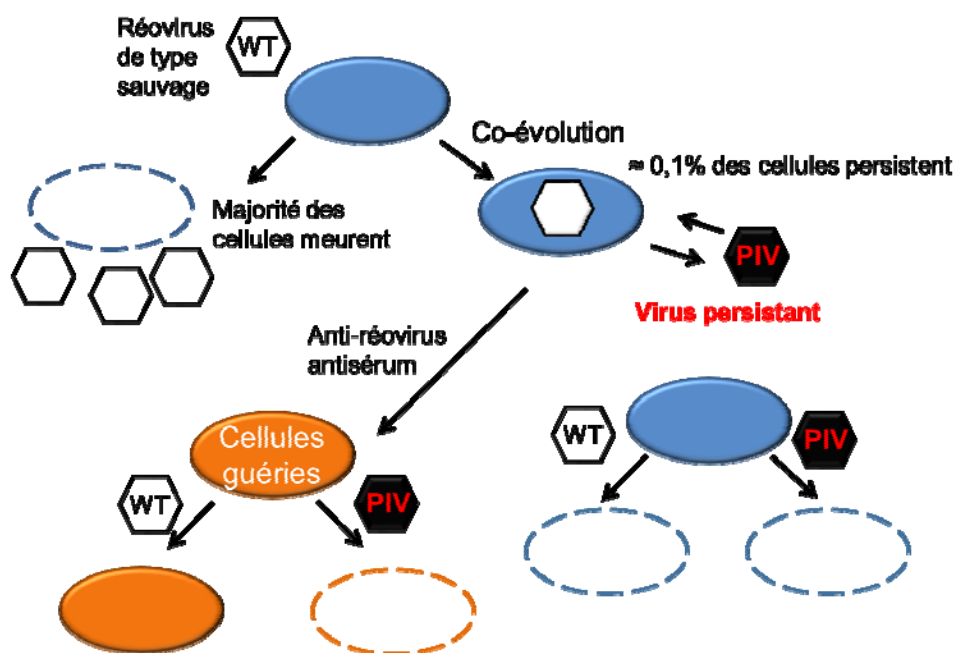


Fig. 10. La persistance cellulaire chez réovirus.

Adaptée de (Lemay, 2009).

3.2.1 Quelques cas de mutants de persistance

3.2.1.1 Mutations affectant les étapes précoces du cycle de réplication

Les cas de persistance les plus connus et les plus étudiés ont été obtenus suite à l'infection de cellules fibroblastiques de souris, les cellules L929. Les mutants de persistance sélectionnés dans ces cellules possédaient surtout des mutations sur sigma3 (Y354H) permettant une décapsidation facilitée du virus (Wetzel et al., 1997; Wilson et al., 2002). Les cellules, en contrepartie, démontraient un défaut de synthèse de la cathepsine L, protéase permettant la décapsidation du virus (Baer et al., 1999).

Rappelons que dans les cellules L929, ce sont des protéases à cystéines (cathepsines B et L) qui sont impliquées dans la décapsidation de réovirus (Ebert et al., 2004; Nibert et al., 1996). *In vitro*, différents agents peuvent affecter négativement la décapsidation. C'est le cas d'inhibiteurs de protéases à cystéines (ex. le E64) et du chlorure d'ammonium (NH₄Cl). Ceux-ci altèrent négativement soit l'activation de protéases spécifiques à la décapsidation de réovirus ou l'acidification de l'endosome, respectivement (Coombs, 2008). Dans le cas du E64, celui-ci est un inhibiteur irréversible, puissant et hautement spécifique envers les protéases à cystéines (calpain, papain, actinidase, bromelain, cathepsine B, H et L). Les sérines protéases ne seront pas affectées. Cet inhibiteur est même utilisé *in vivo* étant donné sa faible toxicité (Govrin and Levine, 1999; Matsumoto et al., 1989). Il est fréquemment utilisé dans les études impliquant des mutants de persistance et/ou de décapsidation chez réovirus (Doyle et al., 2012; Ebert et al., 2001; Golden and Schiff, 2005; Wilson et al., 2002). Les virus ayant une cinétique de décapsidation facilitée sont donc souvent résistants à ces deux inhibiteurs (Baer and Dermody, 1997). De plus, il a été rapporté que lorsqu'on soumet réovirus à des conditions de croissance en présence d'E64 ou de NH₄Cl, la substitution Y354H sur la protéine sigma3 est principalement sélectionnée (Clark et al., 2006; Ebert et al., 2001). Une étude subséquente a par ailleurs démontré que l'effet de la substitution Y354H sur réovirus était aboli lorsqu'on rajoutait la substitution G198E sur sigma3 (Doyle et al., 2012).

D'autres mutants de persistance sélectionnés sur les cellules L929 possédaient des mutations sur la protéine de fixation sigma1 (Ahmed and Fields, 1982; Kauffman et al., 1983; Kim et al., 2011b; Wetzel et al., 1997; Wilson et al., 1996). Dans un des cas, la stabilité de sigma1 semblait être affectée négativement et cela avait un impact sur la fixation aux acides sialiques (Wilson et al., 1996). De plus, des mutations sur sigma1 étaient également sélectionnées suite à une infection persistante sur les cellules MEL (murine erythroleukemia) normalement résistantes à l'infection par réovirus. Ces mutations se situaient dans la région 198 à 204 de sigma1, soit la région importante pour la fixation aux acides sialiques. Un traitement à la neuraminidase, éliminant ainsi les acides sialiques, empêchait la fixation de ces mutants de persistance (Chappell et al., 1997).

3.2.1.2 Persistance au sein des cellules cancéreuses

D'autres cas de persistance furent documentés suite à une infection des cellules cancéreuses HT1080 (fibrosarcome) ou Raji (lymphome de Burkitt humain). Dans les deux cas, les cellules demeuraient vivantes sans lyse cellulaire. Elles développèrent un état de persistance virale et étaient incapables de croître dans des tumeurs xéno greffées tant et aussi longtemps qu'il y avait persistance du virus. Par contre, lorsqu'on élimina le virus de ces cellules (cellules guéries), celles-ci pouvaient croître mais redevaient permissives à réovirus (Alain et al., 2006; Kim et al., 2007). Dans une étude subséquente, les chercheurs sont même parvenus à sélectionner par persistance sur des cellules cancéreuses HT1080, un virus atténué ayant la protéine sigma1 tronquée, mais affichant un meilleur potentiel oncolytique que le réovirus de type sauvage (Kim et al., 2011b).

Suite à cette étude, les chercheurs ont pu établir un lien avec la mort cellulaire lors de l'oncolyse. Il y aurait trois possibilités de scénarios lors de l'oncolyse par réovirus : 1) les cellules meurent par lyse ou par apoptose, 2) il y a persistance virale et perte de croissance tumorale ou 3) les tumeurs qui parviennent à éliminer le virus redeviennent susceptibles lors d'une réinfection par réovirus (Sinkovics and Horvath, 2008).

3.3 Autres mutants historiquement pertinents

Plusieurs mutants de sensibilité à la température (mutants nommés *ts*) ont également permis d'en apprendre davantage sur le rôle de plusieurs gènes de réovirus. Ces mutants défectifs semblent normaux dans des conditions permissives d'incubation (ex : température de 32°C), mais affichent des défauts de croissance à de plus hautes températures dites non permissives (ex : 39°C). Ils ont été sélectionnés via des techniques classiques telles que la mutagenèse chimique, les passages successifs à haute multiplicité d'infection ou encore par infection persistante. Des cas de réversion (intragénique et extragénique) ou encore de suppression ont également été documentés dans ces différents mutants, permettant ainsi de mieux comprendre les interactions entre les protéines (Jayasuriya et al., 1988; McPhillips and Ramig, 1984; Ramig and Fields, 1977, 1979).

Une caractéristique importante du réovirus, notamment au niveau de son évolution, est qu'il possède la capacité de former des réassortants grâce à la nature segmentée de son génome (Fields and Joklik, 1969). Lors d'une co-infection par deux ou plusieurs réovirus différents dans une même cellule, les segments homologues de l'un peuvent s'interchanger (ou se compléter) avec l'autre de façon aléatoire et ainsi produire de nouveaux virus génétiquement différents des virus initiaux. Malgré l'imprécision, le manque de contrôle des gènes interchangés et les étapes de criblage plutôt lourdes, cette technique a tout de même contribué à identifier le rôle de chacun des gènes de réovirus.

3.4 La génétique inverse d'hier à aujourd'hui

3.4.1 Les débuts de la génétique inverse

3.4.1.1 Le système par transfection d'ARN

Sachant que l'ARN viral est infectieux, l'idée de transférer le génome de réovirus dans des cellules afin d'obtenir des virus pourrait sembler, à première vue, facilement exécutable (Roner et al., 1990). Cependant, une transfection dans des cellules L929 par de

l'ARN simple brin positif ou de l'ARN double brin (*in vitro* : transcrits à partir de virions purifiés et dégradés en nucléoïdes) n'était pas suffisante pour produire du virus. Pour des raisons encore mal comprises, il fallait infecter ces mêmes cellules avec un réovirus auxiliaire ou « helper » de type T2J ayant pour caractéristiques de former des plages de lyse lentement (12 jours au lieu de 5 jours pour le T3D). Les virus récupérés formaient des plages de lyse après 5 jours et aucun réassortant n'avait été répertorié. Cette technique était un premier pas vers la génétique inverse, mais l'efficacité de cette méthode était à réévaluer puisqu'on récupérait 0.2 unité formatrice de plages par cellule et 4 % des cellules produisaient du virus. Le même groupe de chercheurs est tout de même parvenu à utiliser cette technique afin de produire des virus mutants sensibles à la température (mutants *ts*) dans les gènes M2 et S2 (Roner et al., 1997).

Peu après, ces mêmes chercheurs ont revu leur protocole et sont parvenus à générer un premier système de génétique inverse pour réovirus. Grâce à cette technique, un virus ayant le gène CAT (chloramphénicol acétyltransférase) inséré au sein du gène S2 a pu être récupéré. Le virus était stable, pouvait se répliquer et il y avait une forte expression du gène CAT. Cependant, la technique était tout de même exigeante en termes de manipulation et de temps puisqu'elle nécessitait la transfection des 9 gènes simple brin de polarité positive ainsi que du transcrit d'ADN complémentaire au 10^e gène modifié. Pour ce faire, on effectuait une transcription *in vitro* des 10 gènes de réovirus. On hybridait ensuite un oligonucléotide sur le gène d'intérêt à modifier, par exemple S2, et on traitait le tout à la ribonucléase H pour dégrader les hybrides ARN-ADN et donc le gène d'intérêt de type sauvage. Le gène S2 modifié devait ensuite être transcrit *in vitro* avec la polymérase T7 et on transfectait le tout avec les protéines traduites *in vitro*. Cette technique nécessitait également une infection par un virus auxiliaire et un criblage assez complexe pour identifier les clones portant la mutation. Pour complexifier le tout, il fallait également que la lignée cellulaire soit adaptée afin de produire la protéine de type sauvage encodée par le gène modifié (Roner and Joklik, 2001). Néanmoins, il demeure que la technique permet une meilleure compréhension de plusieurs aspects de réovirus.

3.4.1.2 Le système par recapsidation

Une autre alternative utilisée pour modifier génétiquement réovirus est la technique de recapsidation ou «recoating». Elle consiste à exprimer une version modifiée de protéines pour ensuite les utiliser pour recapsider le virus à partir d'ISVP ou de core. Par exemple, dans certains laboratoires dont le nôtre, des modifications ont été effectuées sur sigma1, mu1 et sigma3 (Chandran et al., 1999, 2001; Jané-Valbuena et al., 1999). L'idée est de décapsider avec la chymotrypsine un réovirus de type sauvage pour former des ISVPs ou des cores qui seront ensuite mis en présence des protéines sigma1, sigma3 ou mu1 modifiées. On utilise des ISVPs lorsque la protéine sigma3 seule est modifiée et des cores dans les autres cas. Les protéines libres se lieront ensemble pour reformer la capsid du virus. Dans notre laboratoire, l'ajout d'une étiquette hexahistidine a pu être effectué sur la protéine sigma3 du réovirus (Rouault and Lemay, 2003). Cette technique peut donner plusieurs informations pertinentes, mais seules les protéines de la capsid externe peuvent être modifiées et le phénotype n'est visible que sur un cycle de réplication (van den Hengel et al., 2012).

3.4.2 La génétique inverse d'aujourd'hui

Jusqu'à tout récemment, il était donc plutôt ardu de modifier génétiquement le réovirus. Quelques années plus tard, un système de génétique inverse fut généré pour un virus apparenté à réovirus, soit le virus bluetongue. Cette technique permettait le remplacement des 10 segments d'ARNdb qui pouvaient être synthétisés *in vitro* à partir des ADN complémentaires grâce à la polymérase T7 (Boyce et al., 2008). Cette idée a été utilisée pour concevoir la génétique inverse qu'on connaît aujourd'hui.

La technique de génétique inverse à partir de plasmides, utilisée aujourd'hui dans plusieurs laboratoires, dont le nôtre, fut décrite en 2007 par le groupe du Dr Dermody (Kobayashi et al., 2007). C'était la première fois qu'aucun virus auxiliaire n'était nécessaire et qu'aucune manipulation d'ARN n'était requise. L'utilisation de plasmides est d'autant plus facile pour modifier génétiquement les gènes de réovirus par mutagenèse ou par clonage (Kobayashi et al., 2007).

Cette technique requiert principalement les 10 gènes de réovirus incorporés au sein de plasmides sous le contrôle du promoteur de la polymérase T7 (**Fig. 11.**). La transfection cellulaire de ces 10 plasmides additionnés d'une infection avec un vecteur d'une souche faiblement pathogénique du virus de la vaccine exprimant la polymérase T7 permet la transcription et la traduction de ces 10 gènes ce qui entraîne la production virale. Notons qu'aucune trace de protéine du virus de la vaccine n'a été répertoriée dans les virus créés par cette technique, éliminant donc l'étape de criblage autrefois rencontré avec les virus auxiliaires dans les techniques précédentes.

Chacun des 10 plasmides possède donc les gènes complets de réovirus et, tout juste à leur extrémité 5', le promoteur de la polymérase T7, et à leur extrémité 3' la séquence d'un ribozyme du virus de l'hépatite delta suivi de la séquence de terminaison de la polymérase T7. La polymérase du bactériophage T7 a été choisie, car elle dirige préférentiellement l'initiation de la transcription à partir d'un résidu guanosine (Milligan et al., 1987). Tel que mentionné dans la section 1.3, les séquences comprises aux extrémités de chacun des gènes de réovirus (5'-GCUA et UCAUC-3) sont très conservées et seraient impliquées dans l'encapsidation, la répllication et potentiellement la traduction virale (Lemay, 2011). La guanosine est le premier nucléotide présent sur les séquences conservées en 5' de chaque gène de réovirus. Le ribozyme assure quant à lui, par clivage autocatalytique sur l'ARN synthétisé, de conserver la séquence de l'extrémité 3' au nucléotide près sans qu'il y ait ajout d'une queue polyA (Roner and Joklik, 2001).

Mentionnons que dans notre laboratoire ainsi que dans d'autres laboratoires, le virus de la vaccine T7 n'était pas utilisé, on transfectait plutôt les plasmides dans des cellules BHK-21 (baby hamster kidney) modifiées qui expriment constitutivement la polymérase T7 (BHK-T7).

Peu après, l'équipe du Dr Dermody a publié une mise à jour pour le système de génétique inverse en utilisant ces cellules qui étaient une alternative beaucoup plus simple que d'infecter avec le vecteur de la vaccine (Kobayashi et al., 2010). Dans cette mise à jour, on rapporte également la possibilité de combiner sur 4 plasmides les 10 gènes de réovirus, simplifiant ainsi la manipulation et augmentant la production virale (augmenté

d'environ 10 fois). Cependant, il demeure que cette réduction du nombre de plasmides peut complexifier inutilement les manipulations lorsque des mutations doivent être rajoutées sur plusieurs gènes. De plus, les chercheurs ont réussi à récupérer, par cette même technique, le sérotype T1L de réovirus. Ceci ouvre donc la possibilité d'interchanger les gènes de ces deux sérotypes d'une façon plus contrôlée que dans le cas de la technique des réassortants mentionnée plus tôt (Kobayashi et al., 2010). En 2014, une autre petite modification du système de génétique inverse a été rajoutée. On peut maintenant transfecter les plasmides dans des cellules L929, BHK-21 et A549 en utilisant un plasmide encodant la polymérase T7 (Komoto et al., 2014).

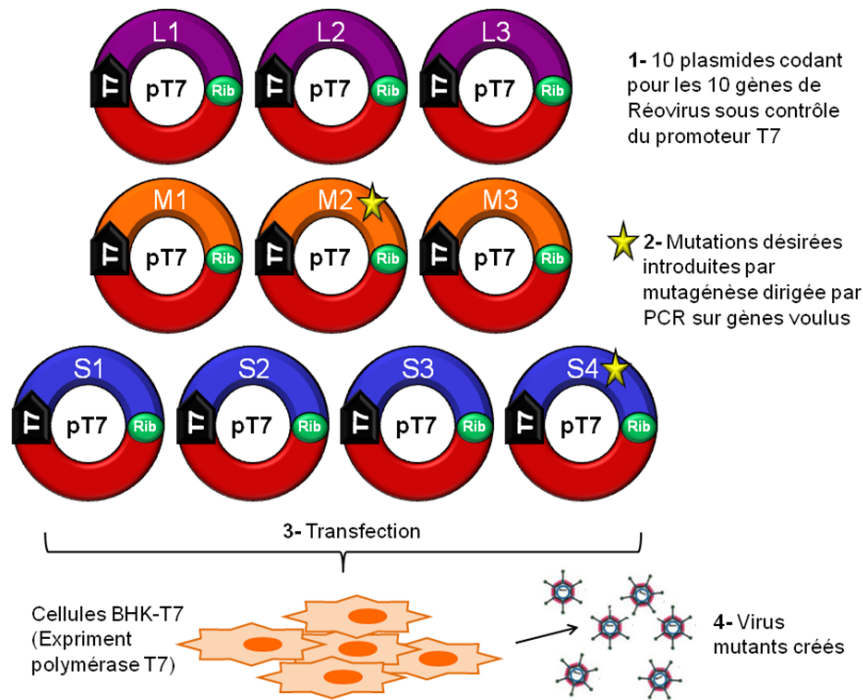


Fig. 11. Le système de génétique inverse établi à partir des segments de réovirus clonés sur des plasmides.

Adaptée de (Kobayashi et al., 2007)

3.4.2.1 Impacts et intérêts

Sommairement, les expériences effectuées dans cette même étude ont permis de confirmer le rôle de certains résidus de réovirus autrefois soupçonnés d'avoir certaines fonctions. À titre d'exemple, les chercheurs sont parvenus à modifier facilement les gènes S1 et S4. Pour le gène S1, codant pour la protéine sigma1, les auteurs ont substitué une isoleucine pour une thréonine en position 241 (I249T) afin de démontrer que cette substitution conférerait une sensibilité à la digestion par la trypsine, comme ce qui avait été proposé dans des études précédentes n'utilisant pas de virus complet (Chandran et al., 2001; Chappell et al., 1998). Des expériences ont par la suite confirmé l'importance de ce résidu dans la propagation virale dans l'intestin et dans le système nerveux central des souris nouveau-nées. En ce qui concerne le gène S4, codant pour la protéine sigma3, les chercheurs ont substitué la tyrosine en position 354 pour une histidine (Y354H) comme ce qui avait été sélectionné et décrit dans les expériences de persistance mentionnées précédemment (section 3.2) (Ebert et al., 2001; Wetzel et al., 1997). Ce changement a effectivement conféré au virus une résistance à l'inhibiteur de protéase (E-64) et une cinétique de décapsidation plus rapide que le virus de type sauvage. Finalement, une expérience cruciale a démontré qu'il est possible de rajouter le gène codant pour l'eGFP (enhanced green fluorescent protein) au sein du gène S4. Le virus était stable et la protéine eGFP était toujours exprimée après 4 passages. Il faut toutefois noter que ce virus, ayant un gène S4 défectueux, doit être propagé dans des cellules produisant la protéine encodée par le gène S4. Ceci permet donc la production de virus ayant des mutations létales dans différents modèles de cellules qui complémenteraient ces défauts. D'autres expériences sont à prévoir pour mieux comprendre le rôle d'autres résidus et même d'autres gènes. Néanmoins, on peut admettre que cette méthode est plutôt simple, rapide et efficace pour créer théoriquement n'importe quelle combinaison de mutations au sein de réovirus.

Cette technique révolutionnaire ouvre évidemment la porte à une multitude de possibilités quant à la modification génétique de réovirus, notamment dans le but d'optimiser son potentiel oncolytique. Théoriquement, on peut penser à modifier la protéine de fixation afin de rendre son interaction plus spécifique avec les cellules

cancéreuses, de faciliter sa décapsidation dans des cellules qui restreignent cette étape du cycle viral, de modifier la sensibilité du virus pour des composantes du système immunitaire tel que l'IFN, de ajouter des séquences complémentaires à des miARN afin de s'assurer de la spécificité de l'infection, de ajouter des gènes codant pour des cytokines permettant le recrutement du système immunitaire au site tumoral, etc. (Van Den Wollenberg et al., 2009).

Bref, en combinant des approches classiques et de génétique inverse, on peut cibler des composantes importantes à réovirus pour diverses étapes de son cycle de réplication dans l'optique d'améliorer ou de mieux comprendre son potentiel oncolytique (Van Den Wollenberg et al., 2009).

3.4.2.2 Limites de la génétique inverse

On ne peut cependant pas exclure, tout comme dans les autres techniques de génétique inverse, qu'en créant des virus par cette technique, d'autres mutations que celles prévues soient engendrées. Il est toujours possible que certaines mutations soient incompatibles ou déstabilisantes pour le virus, l'obligeant ainsi à introduire une mutation compensatoire (Lemay, 2011). On ne peut éliminer complètement la possibilité de générer un virus hautement pathogène de cette façon. Cependant, il existe de nombreuses variations du réovirus que l'on dénomme de type sauvage au sein des différents laboratoires et ces virus ne semblent pas être plus dangereux à notre connaissance. Néanmoins, des précautions sont toujours apportées lorsqu'on travaille avec ce virus.

De plus, il est connu que suite à de nombreux passages, les mutants de réovirus ont tendance à former des révertants ou à acquérir d'autres mutations, ce qui aboutit à la formation de quasi-espèces au sein d'une même population (Van Den Wollenberg et al., 2009). Il ne faut pas exclure aussi le phénomène de dérive génique, où des virus propagés de nombreuses fois sur le même type cellulaire finissent par acquérir diverses mutations leur permettant de s'adapter *in vitro* sur cette lignée cellulaire (Lemay, 2011).

Mentionnons que plusieurs variantes du même sérotype sont observées dans les différents laboratoires travaillant sur réovirus. Cela s'explique en partie dû au fait que les

virus sont souvent isolés par plage afin d'avoir une population clonale et qu'il puisse arriver que, de cette façon, certains virus mutants passent inaperçus et soient sélectionnés. Effectivement, la souche T3D provenant du laboratoire du Dr Fields diffère, entre autres, au niveau de la séquence, de la souche du laboratoire du Dr Joklik qui diffère également du Reolysin® utilisé en essai clinique. Ainsi, plusieurs variantes d'un même sérotype existent d'un laboratoire à l'autre, ce qui soulève la question de ce qu'est un « vrai » réovirus de type sauvage. Cela rend évidemment la caractérisation du virus parfois plus complexe que prévu.

4 Problématiques et objectifs du projet

En somme, le réovirus de mammifère ne cause pas de pathologies graves chez les individus sains. Sa capacité naturelle à cibler préférentiellement les cellules cancéreuses est étudiée depuis de nombreuses années et fait également l'objet d'essais cliniques pour différents types de cancer humain depuis plus de 10 ans. Certaines caractéristiques du virus expliquent partiellement cette activité oncolytique, comme une décapsidation facilitée, une sensibilité à l'IFN, une apoptose plus efficace.

Malgré cela, il demeure que beaucoup d'études sont à envisager pour mieux comprendre et mieux prédire cette activité oncolytique. Ceci permettra certainement d'optimiser ce potentiel. De plus, contrairement à plusieurs autres virus oncolytiques, le réovirus utilisé en essais cliniques ne possède pas de modification génétique. La venue de la technique de génétique inverse permet maintenant la manipulation génétique de ce virus, ce qui permettra potentiellement une maximisation de son potentiel oncolytique. En effet, les modifications peuvent maintenant être ciblées et contrôlées afin d'en étudier le phénotype, ce qui ne pouvait être fait aussi facilement jusqu'à tout récemment. Que ce soit au niveau du tropisme, de la décapsidation, de la sensibilité à l'IFN, les études possibles sont nombreuses et cruciales pour mieux comprendre ce virus.

De plus, jusqu'à maintenant, la technique de génétique inverse n'a été utilisée que dans peu de laboratoires. La liste de laboratoires utilisant la génétique inverse se résume à l'équipe du Dr Dermody (soit seul, en collaboration ou encore dans les laboratoires de ses anciens stagiaires post-doctoraux), le Dr Nibert (1 article (Demidenko et al., 2013)), et notre laboratoire. D'où l'intérêt de mieux valider cette approche de manière indépendante.

À la lumière de cette revue de littérature, nous voulions tirer avantage d'une partie de la diversité des techniques possibles pour modifier le réovirus. Dans cette thèse, nous nous concentrerons majoritairement sur la technique de persistance et la technique de génétique inverse. Ceci nous permettra de répondre à plusieurs questions concernant les différentes composantes de réovirus pouvant être impliquées dans l'oncolyse. Le but général est donc d'utiliser ces techniques afin de mieux comprendre le tropisme, la réplication et les diverses composantes impliquées dans le cycle viral de réovirus. Celles-ci pourraient potentiellement être importantes dans un contexte d'optimisation de son potentiel oncolytique et permettraient une meilleure compréhension d'un éventuel pouvoir pathogène de certaines souches.

4.1 L'adaptation de réovirus sur des cellules Vero

Dans un premier temps, nous voulions tenter d'adapter réovirus à un type cellulaire jusqu'à maintenant jamais testé, soit les cellules Vero. L'intérêt d'utiliser ces cellules est qu'elles ne décapsident pas efficacement réovirus et ne produisent pas d'IFN de type I (α et β) et possiblement de type III (λ) dû à un faible niveau endogène d'IRF3 (Chew et al., 2009; Desmyter et al., 1968; Mosca and Pitha, 1986). Nous voulions ainsi déterminer si l'adaptation dans de telles cellules pouvait sélectionner des mutants de façon similaire ou différente à ce qui avait déjà été répertorié dans les études effectuées dans d'autres types cellulaires.

La première série de résultats décrivant l'adaptation du virus dans les cellules Vero est présentée à la section 5.1 dans l'article publié « **Amino acid substitutions in $\sigma 1$ and $\mu 1$ outer capsid proteins are selected during mammalian reovirus adaptation to Vero cells** » Virus Res. 2013 Sep;176(1-2):188-98.

Pour faire suite à cet article, nous avons poussé plus loin l'étude du mutant précédemment sélectionné et nous avons utilisé la génétique inverse afin d'identifier les résidus importants ainsi que leur rôle. Ceci a fait l'objet d'un deuxième article intitulé « **Amino acids substitutions in σ 1 and μ 1 outer capsid proteins of a Vero cell-adapted mammalian orthoreovirus are required for optimal virus binding and disassembly** » *Virus Res.* (196) 22 January 2015, Pages 20–29. Cet article est présenté dans la section 5.2.

4.2 Étude de la sensibilité à l'interféron du virus P4L-12

Dans un autre projet, nous voulions utiliser la génétique inverse afin de pousser plus loin l'analyse d'un virus précédemment isolé au laboratoire par mutagenèse chimique. Ce virus nommé P4L-12 démontrait une meilleure réplication dans les cellules cancéreuses et un meilleur blocage dans les cellules parentales. Ce phénotype était corrélé avec une sensibilité accrue à l'IFN (Rudd and Lemay, 2005). Après séquençage complet du virus mutant et de type sauvage, nous voulions donc élucider quel(s) résidu(s) serai(en)t important(s) pour cette sensibilité à l'IFN en utilisant la génétique inverse. Nous avons répondu à cette question dans l'article intitulé « **A single amino acid substitution in the mRNA capping enzyme λ 2 of a mammalian orthoreovirus mutant increases interferon sensitivity** » (Soumis à dans la revue « *Virology* » en tant que « Brief communication », décembre 2014). Cet article est présenté dans la section 5.3 de cette thèse.

5 Résultats

5.1 Adaptation de réovirus sur les cellules Vero.

Le premier article de cette section s'intitule « **Amino acid substitutions in σ 1 and μ 1 outer capsid proteins are selected during mammalian reovirus adaptation to Vero cells** ». Virus Res. 2013 Sep;176(1-2):188-98. (Jabre et al., 2013).

Dans ce premier article, nous avons démontré qu'il est possible d'adapter réovirus aux cellules Vero. Contrairement aux autres mutants de persistance précédemment isolés, aucune substitution d'acide aminé sur la protéine sigma3 ne fut sélectionnée et le virus adapté demeurait sensible aux inhibiteurs de protéases et d'acidification des endosomes. Les substitutions d'acides aminés du virus nommé VeroAV (Vero cell-adapted virus) se retrouvaient sur sigma1 et sur mu1, autre élément unique à notre étude. Nous avons également remarqué que le virus était plus sensible à l'IFN que le virus de type sauvage.

Contribution des auteurs :

J'ai collaboré étroitement avec Roland Jabre pour plusieurs expériences. J'ai adapté réovirus aux cellules Vero et j'ai effectué plusieurs expériences qui ont été utilisées pour publication (4 figures sur 7). Nous avons tous les trois contribué à la création de figures et tableaux.

5.1.1 Research highlights

▶ Reovirus adapt to Vero cells upon long-term infection of these cells. ▶ Adapted virus bypasses requirement for prior uncoating to infect Vero cells. ▶ Adapted virus remains sensitive to uncoating inhibitors. ▶ Virus adapted to these interferon-defective cells is more sensitive to interferon. ▶ Adapted virus harbors amino acids substitutions in both $\sigma 1$ and $\mu 1$ proteins.

Amino acid substitutions in σ 1 and μ 1 outer capsid proteins are selected during mammalian reovirus adaptation to Vero cells

Roland Jabre, Véronique Sandekian and Guy Lemay*

Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal, Montréal (Qué.), Canada H3C 3J7

[*Corresponding author. Fax: +1 514 343 5701](mailto:roland.jabre@umontreal.ca)

Département de microbiologie et immunologie

Pavillon Roger-Gaudry

Université de Montréal

C.P. 6128, Succ. Centre-ville

Montréal (Québec)

H3C 3J7

Running title: Reovirus adaptation to Vero cells

Keywords: Reovirus; Mutants; Persistence; Uncoating; sigma1; mu1

5.1.2 Abstract

Establishment of viral persistence in cell culture has previously led to the selection of mammalian reovirus mutants, although very few of those have been characterized in details. In the present study, reovirus was adapted to Vero cells that, in contrast to classically-used L929 cells, are inefficient in supporting the early steps of reovirus uncoating and are also unable to produce interferon as an antiviral response once infection occurs. The Vero cell-adapted reovirus exhibits amino acids substitutions in both the $\sigma 1$ and $\mu 1$ proteins. This contrasts with uncoating mutants from persistently infected L929 cells, and various other cell types, that generally harbor amino acids substitutions in the $\sigma 3$ outer capsid protein. The Vero cell-adapted virus remained sensitive to an inhibitor of lysosomal proteases; furthermore, in the absence of selective pressure for its maintenance, the virus has partially lost its ability to resist interferon. The positions of the amino acids substitutions on the known protein structures suggest an effect on binding of the viral $\sigma 1$ protein to the cell surface and on $\mu 1$ disassembly from the outer capsid.

5.1.3 Introduction (Section 1)

Mammalian reovirus is currently under clinical study as an oncolytic virus for the treatment of various cancers in humans (recently reviewed and discussed by: **Black and Morris, 2012; Harrington et al., 2010; Kelly et al., 2009; Lal et al., 2009**). The rationale behind this approach is the ability of reovirus to preferentially infect and destroy Ras-transformed/cancer cells compared to parental or so-called “normal” cells (**Coffey et al., 1998; Roner and Mutsoli, 2007; Smakman et al., 2005; Strong and Lee, 1996, 1998**). However, the exact mechanism underlying this preferential replication is still incompletely understood. Various observations initially suggested that inhibition of the interferon response by activation of the Ras signaling pathway is responsible for increased efficiency of reovirus infection (**Park et al., 2010; Rudd and Lemay, 2005; Shmulevitz et al., 2010; Strong et al., 1998**). However, it is likely that better viral uncoating is also

involved in increased efficiency of early steps of the viral multiplication cycle in transformed cells (**Alain et al., 2007; Lemay et al., 2007; Marcato et al., 2007**).

Reovirus capsid is made of two concentric protein layers and is incompletely uncoated upon viral entry by endocytosis (reviewed by: **Danthi et al., 2010; Guglielmi et al., 2006**). The outer capsid proteins are partially removed by cellular proteases such as lysosomal cathepsins (L, B or S) (**Ebert et al., 2002; Golden et al., 2004; Johnson et al., 2009**), elastase (**Golden and Schiff, 2005**) or transmembrane serine proteases (**Nygaard et al., 2012**). Partial removal of outer capsid proteins generates infectious subviral particles (ISVPs) that are able to cross endosomal membranes allowing the release of viral particles in the cytoplasm. As an alternative mode of penetration, ISVPs could be generated by extracellular proteases, apparently allowing direct penetration of viral particles through the plasma membrane. In fact, this is probably the major mode of infection in the gastrointestinal tract where proteases are abundant (**Amerongen et al., 1994; Bass et al., 1990; Bodkin et al., 1989; reviewed by: Schiff et al., 2007**).

Although this may not be sufficient to completely explain the preferential infection of transformed cells, an increased level of proteases, protease activity, or changes in subcellular localization of these enzymes, is a known effect of cellular transformation. A correlation between Ras transformation and the level or activity of cathepsins was reported in the past, as well as a redistribution of the enzyme, allowing either secretion or increased presence at the membrane surface (**Cavallo-Medved et al., 2003; Chambers et al., 1992; Collette et al., 2004; Dilakyan et al., 2001; Hiwasa and Kominami, 1995; Joseph et al., 1987; Kim et al., 1998; Urbanelli et al., 2010**). The level or localization of proteases is thus an important factor to determine host-cell permissivity to reovirus and it appears that viral uncoating is often a limiting factor in different cell lines or cell types such as MEF cells (primary murine embryo fibroblasts: **Golden et al., 2002; Nygaard et al., 2012**), MEL cells (murine erythroleukemia cells: **Wetzel et al., 1997a**), NIH-3T3 cells (immortalized murine embryo fibroblasts: **Alain et al., 2007; Marcato et al., 2007**), SC1 cells (murine feral embryo fibroblasts: **Lemay, unpublished data**), U118 cells (human glioblastoma cells: **Alain et al., 2007**) or Vero cells (african green monkey kidney cells: **Golden et al., 2002**).

Despite the fact that reovirus is naturally “oncolytic” and able to discriminate between parental and transformed/cancer cells, without prior genetic manipulation, it is generally believed that it could be adapted to further optimize its oncolytic ability (**Kim et al., 2007; Rudd and Lemay, 2005; Shmulevitz et al., 2012; van den Wollenberg et al., 2009, 2012**). It has been shown that the establishment of persistent reovirus infection leads to a gradual virus-cell co-evolution, resulting in an increased resistance of the cells to the wild-type parental virus while the virus develops an increased ability to infect these cells; this viral adaptation allows maintenance of the persistent state by continuous re-infection (reviewed by: **Dermody, 1998**). However, the nature of mutations present on the viruses resulting from this co-evolution was clearly documented only in murine L929 fibroblasts and results from amino acids substitution(s) in the surface-exposed lobe of the $\sigma 3$ outer capsid protein, thus increasing its sensitivity to proteases and favoring viral uncoating under conditions where proteases are present in limited amount (**Baer and Dermody, 1997; Wetzel et al., 1997b**). It remains to be determined if viruses selected in different cell types will be similarly altered in their ability to be uncoated and if similar amino acids substitution(s) will be selected independently of cell types. It was recently suggested that it is the case, although amino acids substitutions in $\sigma 1$ were also observed (**Kim et al., 2011**). However, the exact role of these amino acids substitutions was not directly established nor further examined. Furthermore, a deletion in $\sigma 1$, the outer capsid cell binding protein (reviewed by: **Danthi et al., 2010**), selected during persistence in one cell line, was also shown to attenuate the virus while having a limited effect on infection of cancer cells, supporting the idea that viral persistence could be used to select for viruses that are better adapted as oncolytic agent (**Kim et al., 2011**).

In the present study, the reovirus serotype 3 Dearing was adapted to Vero cells by establishment of viral persistence. These cells were chosen since they differ from L929 cells by their lack of interferon production (**Desmyter et al., 1968; Emeny and Morgan, 1979**) and were also reported to be inefficient at uncoating the virus, likely due to reduced levels of lysosomal uncoating proteases (**Golden et al., 2002**). The Vero cell-adapted virus (VeroAV) infects Vero cells better than the original wild-type virus in the absence of chymotrypsin and forms plaques under these conditions, in contrast to the wild-type virus, while remaining sensitive to an inhibitor of lysosomal cathepsins; this contrasts

with uncoating mutants selected during viral persistence in L929 cells (**Baer and Dermody, 1997; Wilson et al., 2002**). Furthermore, in the absence of selective pressure for the maintenance of a certain level of resistance, the virus has apparently lost part of its ability to resist interferon. Sequencing of the genes encoding the three outer capsid proteins revealed the absence of amino acids substitution in the $\sigma 3$ protein while two amino acids changes were found in the $\sigma 1$ protein, including one at a location consistent with an increased binding to host cell-surface sugar moieties (**Reiter et al., 2011**). In addition, two amino acids substitution were also found in $\mu 1$ at positions that could affect outer capsid structure or disassembly (**Zhang et al., 2005**) and possibly indirectly affect interferon resistance. Altogether these results support the idea that adapting the virus to different cell types could generate novel viruses to be used as alternatives to the wild-type virus in future oncolytic applications.

5.1.4 Materials and methods (Section 2)

5.1.4.1 Cell lines and viruses

L929 mouse fibroblasts and Vero cells (African green monkey kidney cells) were originally obtained from the American type culture collection (ATCC); all cells were grown in minimal Eagle medium (MEM) with 5% fetal bovine serum, 1% L-glutamine and 1% P/S from commercial stock solutions (Wisent Bioproducts).

Wild-type reovirus laboratory stock was derived from a pure plaque of reovirus type 3 Dearing (T3/Human/Ohio/Dearing/55). The original inoculum was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). A high-passage stock of the virus was obtained by first infecting a semi-confluent 100 mm petri dish of L929 at a MOI of 80; after complete cell lysis, one-twentieth of the cell lysate was used to infect a similar dish; this procedure was repeated each 48 h up to ten passages of the virus.

5.1.4.2 Antibodies

Hybridoma cell lines producing either anti- $\sigma 3$ (4F2) or anti- $\mu 1$ (10F6) have been described (**Virgin et al., 1991**) and were obtained from Kevin Coombs (University of Manitoba). Hybridoma cells were grown in MEM for suspension culture with 10% fetal bovine serum, proline (20 $\mu\text{g/ml}$) and β -mercaptoethanol (50 μM) and antibodies were recovered as previously described (**Brochu-Lafontaine and Lemay, 2012**). The FITC-conjugated goat antireovirus antibody was obtained from Accurate Chemical & Scientific Corporation (catalog # YV0031-10).

5.1.4.3 Determination of virus titer.

Virus titers were determined by plaque assay on Vero cells in the presence of chymotrypsin (Sigma Type I-S from bovine pancreas) at 10 $\mu\text{g/ml}$, as previously described (**Brochu-Lafontaine and Lemay, 2012**).

5.1.4.4 Quantitation of reovirus-infected cells by FACS

To compare the percentage of infected cells, cells were infected at the same multiplicity of infection and analyzed by FACS. Cells from a 6-wells plate were collected by treatment with 6 mM EGTA (ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid) at 37°C for 10 min, 24 h post-infection, and resuspended in 1 ml of EMEM containing 5% fetal bovine serum before recovery by centrifugation at 4°C for 5 min at 1500 x g. The pellet was resuspended in 0.25 ml of cytofix/cytoperm (Becton Dickinson) on ice with gentle agitation and left 20 min before mild centrifugation in microplates at 350 x g. Cells were then resuspended in the 0.25 ml Perm Wash buffer (Becton Dickinson) centrifuged again and resuspended in 0.035 ml of buffer to which 0.015 ml of FITC-conjugated antireovirus antibody was added. Following 30 min on ice with occasional gentle agitation, cells were pelleted, washed twice in buffer, and fixed with 4% paraformaldehyde before being analyzed on a BD FACSCalibur cytofluorometer (Becton Dickinson).

5.1.4.5 Immunoblotting

Infected cells were recovered by scraping in small volume of medium and centrifuged in an Eppendorf tube at 13,000 x g for 5 min at 4°C. Cell pellets corresponding to a 60mm-diameter petri dish were resuspended in 45 µl of permeabilization buffer (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40) and left on ice for 5 min before centrifugation at 13,000 x g for 1 min in an Eppendorf centrifuge at 4°C. Proteins were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting. Nitrocellulose membrane (Whatman Protran BA85) was blocked with 2% non-fat dry milk dissolved in TBS (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, 150 mM NaCl) and incubated for 1 h at room temperature with the anti- $\alpha 3$ and anti- $\mu 1$ monoclonal antibodies. Antibodies in tissue culture medium were diluted with an equal volume of TBS containing the blocking agent and directly used. The diluted antibody solution was recovered and kept at 4°C with 1 mM sodium azide to be used up to 10 times. Membranes were washed in TBS containing 1% Tween-20. Revelation was done using peroxidase-conjugated secondary anti-mouse IgG antibody and chemiluminescent substrate, as recommended by the manufacturer (Pierce SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate). Images were obtained using a Typhoon Trio™ imager (GE Healthcare Life Sciences).

5.1.4.6 Determination of viral sensitivity to uncoating inhibitors

To determine the sensitivity of wild-type and VeroAV to either an inhibitor of endosomal acidification or of lysosomal protease, L929 cells were treated with either 5 mM of ammonium chloride or E64 (L-transepoxy succinyl-leucylamido-[4-guanidino]butane; Sigma-Aldrich) at 50 or 100 µM; control cells were left untreated. Control or treated cells were then infected at a multiplicity of infection of 2 PFU/cell and incubated for 24 h in the presence of the inhibitor. Petri dishes (cells and medium) were frozen at -80°C, 24 h post-infection, and subjected to three cycles of freeze-thaw before virus titration by plaque assay on chymotrypsin-treated Vero cells.

5.1.4.7 Induction of and sensitivity to interferon.

For the detection of induced interferon, L929 cells were infected with either wild-type or VeroAV at a multiplicity of infection of 5 and the supernatant was recovered 12 h post-infection. Recovered supernatant was then passed through a Vivaspin 100,000 molecular weight cutoff filter (Sartorius) to remove infectious reovirus. Virus-free supernatant was then used in encephalomyocarditis titration assay by determination of the “tissue culture infectious dose 50%” (TCID₅₀) on L929 cells, as previously described (Sandekian et al., 2013).

To determine virus' sensitivity to interferon, L929 cells in 96-wells plates were pre-treated with 500 or 100 IU/ml of murine interferon- β (PBL interferon source) and used in TCID₅₀ assay of either wild-type or VeroAV, as previously described (Danis et al., 1997). Number of infected wells was determined by direct examination using phase-contrast microscopy.

5.1.4.8 Sequencing of viral genome segments encoding outer capsid proteins

Virus stocks were used to infect L929 cells in 10 cm-diameter petri dishes at a MOI of 10 PFU/cell. Cells and medium were recovered at 24–30 h post-infection, at which time most cells were lysed. Following two cycles of freeze–thaw (–80°C to room temperature), the lysate was extracted once with one-fourth volume of freon (1,1,2-trichloro-1,2,2,-trifluoroethane, Mallinckrodt Chemicals). After 10 min of centrifugation at 7000 g in a Sorvall SS-34 rotor at 4°C (in Corex 15 ml tubes), supernatant was recovered and overlaid on a 1ml cesium chloride cushion at a density of 1.3 g/ml for ultracentrifugation in a 70Ti rotor at 250,000 g for 1 h at 4°C. Virus pellet was recovered in 400 μ l of TE buffer (10mM Tris–HCl pH 7.5, 1mM EDTA) before addition of 0.2% SDS followed by phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation of viral double-stranded RNA. The RNA was denatured at 95°C for 5 min and cooled rapidly on ice. Reverse transcription was done on both strands using one-fourth of the RNA and oligonucleotides specific for each strand at both ends of the gene to be sequenced. These reverse transcription reactions were done with MLV reverse transcriptase for 1 h at 37°C, as recommended by the manufacturer (Roche). One-fifth of the reverse transcriptase

reaction was then used in a PCR reaction with the same two oligonucleotides for 40 cycles using FastStart protocol, as recommended by the manufacturer (Roche). The PCR fragment was then purified using the Qiaquick PCR purification kit as recommended by the manufacturer (Qiagen) and sequenced by automated DNA sequencing (Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer) in the sequencing service of Institut de recherche en immunologie et cancérologie (IRIC) of Université de Montréal.

The oligonucleotides used for S4 RT-PCR were GCTATTTTTGCCTCTTCCCAGACG (nucleotide 1–24) and GATGAATGAAGCCTGTCCCACGTC (nucleotide 1173–1196 on the complementary strand); sequencing was done using the same two primers as well as CAAGTTGGACAGATCCTTTGCAG (nucleotide 472–494) and GGGTATCAAGTCGGATGAGTCGA (nucleotide 553–575 on the complementary strand).

For the M2 gene two separate RT-PCR fragments were used to cover the whole gene: oligonucleotides GCTAATCTGCTGAGCGTACTCTG (nucleotide 1–24) and CCGATCTGTGAAGCAGCAGTCC (nucleotide 1267 to 1288 on the complementary strand) were used together to amplify the 5' portion of the gene while oligonucleotide CTGGACCAAATCGCTCCGATGCGG (nucleotide 1137–1160) and GATGATTTGCCTGCATCCCTTAACCCCG (nucleotide 2176–2203 on the complementary strand) were used to amplify the 3' portion. Sequencing was done with the same primers and with primers CTGCTGGATGATCAGCTGCCAG (nucleotide 681–702), CTGGACCAAATCGCTCCGATGCGG (nucleotide 1137–1160), GGTCAGCTTGCTATCTCGCAACTCG (nucleotide 1737–1761) and CTAAGGGTGGGGCTGATGCTGAA (nucleotide 845–867 on the complementary strand).

For sequencing of the S1 gene two PCR fragments were obtained and sequencing was performed with five different primers. RT-PCR products were thus obtained using either GCTATTGGTCGGATG (nucleotide 1–15) and ATTCCGATACCGCCGCTAACATCA (nucleotide 915–938 on the complementary strand) or a combination of GACTCTCAAGACGACTGTGTTTG (nucleotide 708–730) and AGTGCCGCGGGGTGGTCTGATC (nucleotide 1382–1403 on the complementary

strand). Sequencing was performed with primers GCTATTGGTCGGATG (nucleotide 1–15), GACTCTCAAGACGACTGTGTTG (nucleotide 708–730), ATGTTAGCGGCGGTATCGGAATGA (nucleotide 917–940), AGCTCTGCAAGTCCTGTCTCAAGT (nucleotide 345–368 on the complementary strand) and AGTGCCGCGGGGTGGTCTGATC (nucleotide 1382–1403 on the complementary strand).

Sequences used for comparisons were obtained from the NCBI database. Accession numbers of the reverse genetics clones used as reference sequence were ABP48922 (for $\sigma 3$), ABP48917 (for $\mu 1$) and ABP48919 (for $\sigma 1$).

5.1.5 Results (Section 3)

5.1.5.1 Production of a Vero cell-adapted virus (VeroAV)

Vero cells were infected with a laboratory stock of wild-type reovirus serotype 3 Dearing (T3/Human/Ohio/Dearing/55). Viral stocks used were first propagated in standard conditions of low multiplicity of infection (1 PFU/cell), or at a high multiplicity of infection, as described in Section 2. Such high-passage reovirus stocks resulting from serial propagation at a high multiplicity of infections are known to harbor a mixture of mutants and defective viruses and were used by various groups to facilitate establishment of viral persistence (Ahmed and Fields, 1982; Ahmed and Graham, 1977; Ahmed et al., 1980; Dermody et al., 1993). Using either of the two virus stocks, gradual cell death was observed in infected Vero cells with the presence of large cytoplasmic inclusions typical of reovirus infection (data not shown). However, a significant proportion of the cells remained alive in the culture despite obvious viral-induced cytopathic effects. Cells infected with the high-passage stock of virus were maintained and propagated with occasional passage with trypsin. Cell death transiently increased each time the cells were passaged but a significant proportion of infected cells remained alive and gradually adapted until a cell culture presenting minimal cell death and cell growth indistinguishable from that of parental cells, was finally obtained. Analysis of virus produced by these cells was undertaken 21 weeks after the initial infection.

Cell-free supernatant was recovered and readily destroyed L929 cells, indicating the presence and release of infectious virus in the culture of Vero cells despite absence of apparent cytopathic effect at this time. Since this was not the purpose of the present study, the “persistently infected” Vero cells themselves were not further examined.

The Vero cell-adapted virus (VeroAV) was further propagated on L929 cells and viral titer was determined by plaque assay on Vero cells in the presence of chymotrypsin. VeroAV reaches titers similar to that of the wild-type virus under similar propagation conditions. The limiting dilution, TCID₅₀ method was also used to determine virus titers on L929 cells using 96-multiwell plates (**Danis and Lemay, 1993**). The relative titers were between 1.3-fold lower to 1.9-fold higher by plaque assay for VeroAV compared to the wild-type virus. This small difference between the two methods could be explained, at least in part, by different plaque size for the two viruses as discussed in the following section.

5.1.5.2 Infectivity of VeroAV

Titration of infectious virus on Vero cells was initially performed in the presence of chymotrypsin, since wild-type virions are unable to form plaques on these cells in the absence of exogenous proteases (**Brochu-Lafontaine and Lemay, 2012**) (**Fig. 1A**); even under the microscope foci were very small in the absence of chymotrypsin and consisted of only few cells with incomplete lysis (**Fig. 1B**, panel a). This is consistent with the previous report showing that infection of Vero cells is relatively inefficient but that this blockage can be overcome by prior treatment with a protease, such as chymotrypsin, to generate ISVPs (**Golden et al., 2002; Nygaard et al., 2012**). Accordingly, large plaques were readily formed when chymotrypsin was added to the agar overlay used for viral titration (**Fig. 1A and B**), as previously described (**Brochu-Lafontaine and Lemay, 2012**). In contrast, VeroAV is able to bypass the restriction normally observed in Vero cells and forms plaques in the absence of chymotrypsin (**Fig. 1A and B**), while plaques formed by VeroAV in the presence of chymotrypsin were smaller than that observed with the wild-type virus (**Fig. 1A and B**).

The infection by the two viruses was then compared on a single infection cycle using detection of intracellular viral antigens by FACS analysis of permeabilized cells, essentially as described by others (Kim et al., 2010; Marcato et al., 2007); a commercially available antireovirus antibody directly conjugated to FITC, was used to facilitate the procedure, as previously used (Sandekian et al., 2013) and described in Section 2. In preliminary assays, the proportion of L929 cells infected with the wild-type virus at a multiplicity of infection of 1 PFU/cell was approximately 50% compared to a theoretical value of 63%, according to the Poisson distribution (data not shown). It thus appears that the procedure does adequately reflect the efficiency of viral infection. The efficiency of infection of VeroAV was then compared with that of the wild-type virus; a representative experiment is presented on **Fig.2**. On Vero cells, in the absence of chymotrypsin, infection by the wild-type virus was very low compared to that on L929 cells, the average of two different experiments indicated that infection was approximately fourfold more efficient in L929 cells while for VeroAV the difference was less than twofold between the two cell lines. Addition of chymotrypsin on Vero cells increased infection of the wild-type virus by at least sixfold on average, consistent with results obtained by plaque assay. In contrast the effect of chymotrypsin on efficiency of VeroAV infection was at most twofold, indicating that the infection of Vero cells by VeroAV is largely independent of prior uncoating.

These results were further confirmed by immunoblotting analysis of the viral proteins synthesized during viral replication (**Fig. 3**). As expected, the addition of chymotrypsin to the medium allowed the wild-type virus to bypass the restriction while there was essentially no effect, under the same conditions, with VeroAV. VeroAV was already able to efficiently infect Vero cells in the absence of chymotrypsin, as observed in both plaque assay and FACS-based analysis. On L929 cells, VeroAV and wild-type virus were similar or even slightly better for VeroAV, as also previously observed by FACS.

5.1.5.3 Replicative ability of VeroAV

Virus titers produced upon one-cycle of replication in Vero cells were next examined (**Fig. 4A**). In the absence of chymotrypsin, VeroAV produced slightly more

infectious virus than the wild-type virus. As expected, there was an increase in virus titer in the presence of chymotrypsin with the wild-type confirming that infection by the wild-type virus is increased by prior uncoating of the virions. However, in the same conditions, VeroAV titer obtained was actually decreased, an observation that is reminiscent of the small plaques produced by this virus in the presence of chymotrypsin (**Fig.1**). The protocol was then modified by removal of the chymotrypsin 4 h post-infection (**Fig.4B**), allowing proteolytic uncoating of the initial virus inoculum but avoiding the action of chymotrypsin on released viral particles. Under these conditions, wild-type virus titer was more than 100-fold higher when chymotrypsin was used, further indicating the positive effect of prior uncoating and indicating that the chymotrypsin had a negative effect on the infectivity of the released viral particles under these conditions of one-cycle viral replication. VeroAV titer remained higher than that of wild-type but was only slightly increased by chymotrypsin treatment, indicating that it is less dependent on prior uncoating for infection but more sensitive to the negative effects of chymotrypsin on released virions. When the experiment was repeated with a concentration of chymotrypsin reduced from 20 to 5 $\mu\text{g/ml}$, virus titer of the wild-type virus was significantly increased (more than 500-fold) while VeroAV titer was only increased fivefold (data not shown). Under these conditions, removal of chymotrypsin after 4 h did not change the results. This further supports the idea that chymotrypsin increased infectivity of the wild-type virus but has only a limited, and even negative, effect on VeroAV. Again, this is probably reflected by the smaller plaque size observed with this virus in the presence of chymotrypsin (as shown on **Fig. 1**).

Replicative ability of VeroAV also correlated with cytopathic effects observed upon infection (data not shown). In the absence of chymotrypsin, Vero cells were quite resistant to viral-induced cytopathic effect with the wild-type virus at a multiplicity of infection of 2 PFU/cell. In contrast, cytopathic effects were observed as early as 24 h post-infection with VeroAV and essentially all cells were destroyed by 48 h post-infection. When chymotrypsin was present, cytopathic effect was evidenced for both wild-type virus and VeroAV; cytopathic effect was already observed at 24 h post-infection and essentially all cells were killed by 48 h.

5.1.5.4 Characterization of early events during infection by VeroAV

Since infection of Vero cells with the wild-type virus seems to rely on prior *in vitro* protease treatment, it was first suspected that the increased infectivity of VeroAV could be due to enhanced uncoating. This is normally accompanied by a reduced requirement for intracellular proteases during infection by virions and thus a reduced sensitivity to both inhibitors of lysosomal acidification, such as ammonium chloride (NH₄Cl), or inhibitors of lysosomal uncoating proteases, such as E64 (Clark et al., 2006; Ebert et al., 2001). This was examined in L929 cells that have been extensively used in the literature for such studies. VeroAV and wild-type viruses exhibited a similar sensitivity to 5 mM NH₄Cl, titers being reduced approximately 10-fold at this concentration (data not shown). This was further studied using E64 as a more specific inhibitor (Fig. 5). Again, both virus titers were similarly reduced 5–10-fold at the 50 μM concentration and between 30 and 50-fold at the 100 μM concentration, VeroAV thus being at least as sensitive as the wild-type virus. This suggests that the replication of VeroAV in the absence of chymotrypsin is not due to a reduced requirement for cysteine protease in the lysosomal compartment and that VeroAV is not an uncoating mutant.

5.1.5.5 Induction of, and resistance to, interferon by VeroAV

As mentioned in Section 1, Vero cells were chosen since, in addition to their limited ability to uncoat reovirus, they are also unable to produce interferon. Viruses could thus potentially lose their ability to control the interferon response, if this allows to gain other properties beneficial to viral maintenance and/or replication in Vero cells. Such viruses will be either more prone to induce interferon in interferon-competent cell lines, such as L929 mouse fibroblasts cells, or more sensitive to the antiviral action of interferon in these cells.

Induction of interferon was examined by measuring the antiviral effect of the supernatant from L929 cells infected with either the wild-type or VeroAV reovirus; the antiviral activity was measured against the unrelated encephalomyocarditis virus (EMCV), as previously described (Sandekian et al., 2013). Supernatant from cells infected with either wild-type or VeroAV were both protective against EMCV. The

undiluted supernatant recovered at 12 h post-infection with each virus could decrease apparent EMCV titer from 5.4×10^9 PFU/ml to 8.4×10^8 for the wild-type virus and 7.4×10^8 for VeroAV. Therefore, it does not appear that VeroAV could induce more interferon than the wild-type, parental, reovirus. This is also consistent with the presence of a proline at amino acid 208 of $\mu 2$ on both the wild-type and VeroAV (data not shown), an amino acid position known to be responsible for differences in interferon induction between different reovirus strains (**Irvin et al., 2012**).

Sensitivity of VeroAV to interferon was next determined by TCID₅₀ titration of parental wild-type virus or VeroAV on murine L929 fibroblasts in the presence of 500 international units (IU)/ml of mouse β -interferon. At this high interferon concentration, virus titer was decreased by approximately 6000-fold for the wild-type virus and more than 24,000-fold for VeroAV (data not shown), suggesting an increased sensitivity of the latter. The experiment was repeated at a lower interferon concentration (100 IU/ml) and, under these conditions, VeroAV was clearly more sensitive, its titer being decreased by more than a 1000-fold, while the wild-type virus titer was decreased only 15-fold (**Fig. 6**); VeroAV is thus essentially as sensitive as the “interferon-hypersensitive” P4L-12 mutant that was previously described (**Rudd and Lemay, 2005**).

5.1.5.6 Sequencing of viral genes encoding outer capsid proteins of VeroAV

Altogether, the three outer capsid proteins, $\sigma 1$, $\sigma 3$ and $\mu 1$, are responsible for virus binding and entry into host cells (most recently reviewed by: **Danthi et al., 2010**). In view of the previous results, indicating a decreased requirement of prior outer capsid removal for VeroAV infection of Vero cells, while the virus remained sensitive to inhibitors of intracellular outer capsid removal, the sequence of the genes encoding the three outer capsid proteins of VeroAV was determined. The original wild-type laboratory virus stocks, as well as the high-passage virus stock used to establish VeroAV-infected cells, were sequenced in parallel to better assess the significance of eventual amino acid substitutions in VeroAV. Although there are certainly numerous mutants in the high-passage stock, there was no apparent differences with the original wild-type stock when

PCR products were directly sequenced, reflecting the lack of selection of a new virus under these conditions. The sequences were also compared with the sequences reported for the genes of reovirus serotype 3 Dearing in the plasmids used for the generation of infectious virus by reverse genetics (**Kobayashi et al., 2007**).

The $\sigma 3$ protein of VeroAV has no amino acid substitutions compared to the original virus that is also identical with the sequence of the reverse genetics clone; this absence of substitution in Vero AV contrasts with all known uncoating mutants but is consistent with the fact that VeroAV behaves differently from such mutants. In contrast, two amino acids substitutions were found in the $\sigma 1$ protein of VeroAV compared with both the original wild-type virus and the reverse genetics virus, the Q78P and N198K substitutions. Three other substitutions (T249I, T408A and Y253S) were also found between wild-type and VeroAV on one hand, and the reverse genetics virus on the other hand. Comparisons with sequences in database are difficult due to extensive differences in $\sigma 1$ protein when different serotypes are compared. Nevertheless, the T249I and T408A substitutions, compared to the sequence of the reverse genetics virus, were also found to be present in more than half the sequences of type 3 viruses in the NCBI database; however, the Y253S substitution appears to be unique to the viruses used in the laboratory at the present time.

The $\mu 1$ protein of VeroAV also exhibits two different amino acids substitutions compared to the original wild-type virus and to the reverse genetics virus, the E89G and A114V substitutions. These two amino acids are conserved between different mammalian reoviruses of all four serotypes present in the NCBI database; two other differences between both the wild-type virus and VeroAV compared to the reverse genetics virus were also noted, the A305V and A449T substitution. While a valine is, in fact, observed more frequently than alanine at position 305 in sequences of all serotypes, the alanine at position 449 is conserved and A449T represents a novel variant of $\mu 1$ in the virus' laboratory stock.

5.1.6 Discussion (Section 4)

As with most viruses, reovirus' ability to infect different cell types and the final outcome resulting from this infection, cell death or persistence establishment, has been mostly studied in one cell type, namely the L929 mouse fibroblasts. In the last few years, there has been a renewed interest to study reovirus replication and virus-host cell interactions. This is certainly largely due to current efforts to introduce the virus as an oncolytic agent. A better understanding of the virus' replication in different cell types could allow to better adapt the virus to specifically infect, replicate in, and kill cancer cells (**Kim et al., 2007, 2011; Rudd and Lemay, 2005; Shmulevitz et al., 2012; van den Wollenberg et al., 2009, 2012**).

As mentioned in Section 1, there has been relatively few detailed characterization of viruses adapted through persistence establishment; in the most-studied L929 cells model, there were many different amino acid substitutions on $\sigma 1$, depending on the virus, and a single amino acid substitution on $\sigma 3$ (Y354H). This last substitution was later shown to be most important and results in an increased ability of the virus to be uncoated (**Dermody, 1998**). Amino acids substitution in $\sigma 3$ was most often observed in viruses recovered from other persistently infected cell lines although $\sigma 1$ substitutions were also frequent, but the exact importance of these amino acids substitutions was not clearly established. (**Kim et al., 2011**). It should be mentioned that the sequence of the other genes, including that of the segment encoding the third outer-capsid protein, the $\mu 1$ protein, was not examined in this study. Virus persistence was also reported in CHO cells (**Taber et al., 1976**), MDCK cells (**Montgomery et al., 1991**), SC1 feral mouse embryo fibroblasts (**Danis et al., 1993**) and Balb-3T3 mouse fibroblasts (**Verdin et al., 1986**) but detailed characterization of the resulting viruses is still lacking.

Vero cells chosen in the present study appeared relatively resistant to reovirus while efficiency was increased by prior chymotrypsin treatment resulting in uncoating of the virion. However, this could be due to different factors in addition to a defect of uncoating in these cells that could be bypassed by prior removal of outer capsid protein $\sigma 3$ and proteolytic cleavage of outer capsid $\mu 1$. An increased ability to bind onto sialic acid at the

cell surface upon virion to ISVP proteolytic conversion could also be responsible for the increased infectivity of ISVPs (**Chappell et al., 1998; Nibert et al., 1995**; reviewed by: **Danthi et al., 2010; Schelling et al., 2008**). Finally, a change in the efficiency of final disassembly steps could lead to increased infectivity due to increased ability of the viral particles to cross the cellular, or endosomal, membrane.

Despite their relative resistance to reovirus, infected Vero cells gradually developed cytopathic effects and a significant cell death was observed. This was maintained for a long time before a balance was apparently established and cell death became inapparent in the culture of “persistently-infected” cells. Evolution of the cells was not studied further in this manuscript but the evolution of the virus was evidenced by the apparent lack of remaining wild type sequence for either the $\sigma 1$ or $\mu 1$ encoding gene in VeroAV. However, when individual clones were obtained from the PCR products and individually sequenced, amino acids substitutions in $\sigma 1$ were consistently observed while the exact nature of amino acids changes in $\mu 1$ was variable (**Table 2**), although the two substitutions E89G and A114V were by far the most frequent. Interestingly, in a previous attempt to adapt the wild-type virus to Vero cells, the virus was collected after only 8 weeks; in this virus, the N198K substitution on $\sigma 1$ was already found but not the Q78P while there was no substitution on $\mu 1$. This suggests that the N198K could be most important in the adaptation to Vero cells.

As previously mentioned, Vero cells possess two known interesting properties that may affect the nature of the virus recovered upon adaptation to these cells. Vero cells lack the ability to produce interferon (**Desmyter, et al., 1968; Emeny and Morgan, 1979**), thus likely making them more susceptible to reovirus replication and propagation once they are infected. They also exhibit a reduced ability to uncoat the virus, thus probably limiting initial entry steps. It is thus expected that the virus will evolve toward an increased ability to initiate viral infection. Surprisingly, in contrast to classical uncoating mutants, VeroAV was sensitive to the inhibitor of cysteine protease and, accordingly, the $\sigma 3$ protein did not show an altered sequence. This contrast with the situation observed with viruses recovered from persistently-infected murine SC1 cells; although these cells are also deficient in interferon response (**Danis et al., 1997**) and ability to uncoat the virus (unpublished data), an amino acids substitution in the outer lobe of the $\sigma 3$ protein was

observed in that case (**Table 1**). In all other reports of viral isolates from persistently infected cells, an amino acid substitution in $\sigma 3$ was also observed, although substitutions in $\sigma 1$ were also often found (**Table 1**).

The available crystal structure of the $\sigma 3$ - $\mu 1$ heterohexamer that forms the bulk of the outer capsid (**Liemann et al., 2002**) and the high-resolution structure of the virion by electron cryomicroscopy (**Zhang et al., 2005**) permit some prediction. The E89 residue is positioned in the predicted contact zone between neighboring heterohexamers at their basis in the most inner part of the outer capsid (**Fig. 6**) while the A114 position is located at a position suggesting a possible effect on the interaction between the three $\mu 1$ molecules of each heterohexamer (**Fig. 7**). Either one, or both, of these changes could alter outer capsid stability and/or disassembly; interestingly, amino acids substitutions that affect the stability of the $\sigma 3$ - $\mu 1$ heterohexamer were previously observed in these regions (**Agosto et al., 2007; Middleton et al., 2007**), including one of E89 that appears to render the virus thermolabile and thus potentially destabilizes the capsid and favors virus entry and disassembly under normal temperature conditions. The amino acids substitutions in $\mu 1$ are thus likely responsible for the changes in sensitivity of VeroAV to chymotrypsin, as reflected in reduced plaque size. The interaction between $\sigma 3$ and $\mu 1$ appears to be essential in the control of the function of these two proteins when they are under their free form in the cytoplasm (reviewed by: **Schiff, 1998; 2008**). The $\sigma 3$ protein is believed to inhibit the dsRNA dependent protein kinase (PKR) activation due to its ability to bind the double-stranded RNA (dsRNA) activator of PKR (**Beattie et al., 1995; Giantini and Shatkin, 1989; Imani and Jacobs, 1988; Lloyd and Shatkin, 1992; Yue and Shatkin, 1997**), an ability that is lost upon its interaction with $\mu 1$ (**Huismans and Joklik, 1976; Lemieux et al., 1987**); this is likely one important factor that could affect virus' sensitivity to interferon (reviewed by: **Samuel, 1998; Sherry, 2009**). Accordingly, the PKR inhibition and resulting effect on host translation is likely dependent on the relative level of free $\sigma 3$ compared to $\mu 1$ -bound $\sigma 3$ (**Schmechel et al., 1997**). Reciprocally, the $\mu 1$ -induced apoptosis is increased in absence of $\sigma 3$ (**Coffey et al., 2006**). Numerous strands of evidence indicate that dsRNA and $\mu 1$ binding by $\sigma 3$ are mutually exclusive (**Bergeron et al., 1998; Huismans and Joklik, 1976; Lemieux et al., 1987; Liemann et al., 2002; Shepard et al., 1996**) Increased sensitivity of VeroAV to interferon, in absence of any

change in interferon induction, is thus consistent with the idea that a change in the efficiency of heterohexamers formation, resulting from amino acids substitutions in $\mu 1$, can indirectly affect the control of PKR by $\sigma 3$ and, therefore, virus' sensitivity to interferon.

The contact regions between $\mu 1$ in neighboring heteroxamers are also similar to the contact regions between $\mu 1$ and $\lambda 2$ forming the turret through which $\sigma 1$ trimers are anchored and exposed at the virion's surface (**Liemann et al., 2002; Middleton et al., 2007; Zhang et al., 2005;**). The nature of the $\mu 1$ protein could thus indirectly affect the association and exposure of $\sigma 1$ at the virion's surface. Interestingly, it was recently suggested that amino acids changes in $\lambda 2$ itself could affect the function of $\sigma 1$, probably by modulating its association to the virion or exposure at the virion's surface (**Shmulevitz et al., 2012**). It should also be remembered that $\sigma 1$ and $\mu 1$ are involved in binding and entry steps in viral infection, and it is thus somehow expected that these two phenomena need to be well adapted to each other. Accordingly, a role of $\mu 1$ in a $\sigma 1$ -determined phenotype was also previously observed in different contexts, such as apoptosis, neurovirulence or development of oily fur syndrome (**Clarke et al., 2001; Derrien et al., 2003; Hrdy et al., 1982; Rodgers et al., 1997; Tyler et al., 1996**). Interestingly, in a Vero cell-adapted avian reovirus, gene reassortment experiments assigned the adaptive changes to both the σC cell-binding moieties homologous to $\sigma 1$ and the μB major outer capsid protein homologous to $\mu 1$ (**Meanger et al., 1999**). This further supports the idea that these two proteins functionally interact and are essential in virus' adaption to Vero cells.

Interestingly, although the asparagine-198 of $\sigma 1$ is not directly involved in the binding to sialic acid, it was previously shown that its substitution by an acidic amino acid (N198E) does prevent binding (**Chappell et al., 1997; Dermody et al., 1990; Reiter et al., 2011**). It is thus possible that substitution by a basic amino acid, as in VeroAV (N198K), could rather positively influence this binding and could be responsible for better infectivity on Vero cells.

In the last few years, a powerful plasmid-based reverse genetics approach has been introduced for the study of mammalian reovirus (**Kobayashi et al., 2007; reviewed by: Boehme et al., 2011; van den Hengel et al., 2013; Lemay, 2011**). This approach could

be envisaged in the future to determine the respective roles of $\sigma 1$ and $\mu 1$ amino acids substitution of VeroAV in increased infectivity in Vero cells and increased sensitivity to interferon. However, it cannot be excluded that these properties cannot be separately attributed to one of the two genes and that single amino acids substitutions will not be compatible in the wild type virus genetic background, especially that encoded by the plasmids of the reverse genetics systems.

Altogether, the work described herein is a good illustration that reovirus infection and replication need to be further investigated in cell types that differ from the traditionally used models. Clearly, selection of novel viruses during viral persistence is more complex than selecting for $\sigma 3$ proteins that are more susceptible to uncoating proteases. The use of heterogeneous viral populations that can be adapted to different cells or different conditions thus remains a powerful approach to identify novel viral adaptations that could be of interest in the development of reovirus as a virotherapy agent. Although we do not have evidence that this particular virus (VeroAV) has a superior oncolytic activity, it was recently shown (**Shmulevitz et al., 2012**) that selection of large-plaque variants on L929 cells, as observed with VeroAV on Vero cells, could generate better oncolytic viruses. It will thus be of interest to pursue the characterization of VeroAV in cancer cell lines. In the future, long-term adaptations of reovirus to cells harboring well-defined genetic alterations in cellular immortalization/transformation pathways could become a powerful approach to better evaluate critical host-cell properties for optimal reovirus replication, propagation, and host-cell killing. In addition to such well-defined cellular models, human cancer cell lines could be used to select novel reovirus for an optimal oncolytic effect in different tumor cell types.

5.1.7 Acknowledgments

We thank Dr Kevin Coombs (University of Manitoba) for the hybridoma cells producing antireovirus monoclonal antibodies.

This work was supported by an operating grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to G.L. R.J. was also supported by NSERC summer studentships. We also thank the “Faculté des études supérieures” of “Université de Montréal” for partial financial support to V.S.

The authors also thank Virginie Brochu-Lafontaine for numerous helpful discussions as well as Serge Sénéchal for his technical support in FACS analysis.

5.1.8 References

- Agosto, M.A., Middleton, J.K., Freimont, E.C., Yin, J., Nibert, M.L., 2007. Thermolabilizing pseudoreversions in reovirus outer-capsid protein micro 1 rescue the entry defect conferred by a thermostabilizing mutation. *Journal of Virology* 81, 7400–7409.
- Ahmed, R., Fields, B.N., 1982. Role of the S4 gene in the establishment of persistent reovirus infection in L cells. *Cell* 28, 605–612.
- Ahmed, R., Graham, A.F., 1977. Persistent infections in L cells with temperature-sensitive mutants of reovirus. *Journal of Virology* 23, 250–262.
- Ahmed, R., Chakraborty, P.R., Fields, B.N., 1980. Genetic variation during lytic reovirus infection: high-passage stocks of wild-type reovirus contain temperature-sensitive mutants. *Journal of Virology* 34, 285–287.
- Alain, T., Kim, T.S., Lun, X., Liacini, A., Schiff, L.A., Senger, D.L., Forsyth, P.A., 2007. Proteolytic disassembly is a critical determinant for reovirus oncolysis. *Molecular Therapy* 15, 1512–1521.
- Amerongen, H.M., Wilson, G.A., Fields, B.N., Neutra, M.R., 1994. Proteolytic processing of reovirus is required for adherence to intestinal M cells. *Journal of Virology* 68, 8428–8432.
- Baer, G.S., Dermody, T.S., 1997. Mutations in reovirus outer-capsid protein sigma3 selected during persistent infections of L cells confer resistance to protease inhibitor E64. *Journal of Virology* 71, 4921–4928.
- Bass, D.M., Bodkin, D., Dambrauskas, R., Trier, J.S., Fields, B.N., Wolf, J.L., 1990. Intraluminal proteolytic activation plays an important role in replication of type 1

- reovirus in the intestines of neonatal mice. *Journal of Virology* 64, 1830–1833.
- 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. *Journal of Virology* 69, 499–505.
- Bergeron, J., Mabrouk, T., Garzon, S., Lemay, G., 1998. Characterization of the thermosensitive ts453 mutant: increased dsRNA binding of sigma 3 protein correlates with interferon resistance. *Virology* 246, 199–210.
- Black, A.J., Morris, D.G., 2012. Clinical trials involving the oncolytic virus, reovirus: ready for prime time? *Expert Review in Clinical Pharmacology* 5, 517–520.
- Bodkin, D.K., Nibert, M.L., Fields, B.N., 1989. Proteolytic digestion of reovirus in the intestinal lumens of neonatal mice. *Journal of Virology* 63, 4676–4681.
- Boehme, K.W., Ikizler, M., Kobayashi, T., Dermody, T.S., 2011. Reverse genetics for mammalian reovirus. *Methods* 55, 109–113.
- Brochu-Lafontaine, V., Lemay, G., 2012. Addition of exogenous polypeptides on the mammalian reovirus outer capsid using reverse genetics. *Journal of Virological Methods* 179, 342–350.
- Cavallo-Medved, D., Dosescu, J., Linebaugh, B.E., Sameni, M., Rudy, D., Sloane, B.F., 2003. Mutant K-ras regulates cathepsin B localization on the surface of human colorectal carcinoma cells. *Neoplasia* 5, 507–519.
- Chambers, A.F., Colella, R., Denhardt, D.T., Wilson, S.M., 1992. Increased expression of cathepsins L and B and decreased activity of their inhibitors in metastatic, ras-transformed NIH 3T3 cells. *Molecular Carcinogenesis* 5, 238–245.

- Chappell, J.D., Gunn, V.L., Wetzel, J.D., Baer, G.S., 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 $\sigma 1$. *Journal of Virology* 71, 1834–1841.
- Chappell, J.D., Barton, E.S., Smith, T.H., Baer, G.S., Duong, D.T., Nibert, M.L., Dermody, T.S., 1998. Cleavage susceptibility of reovirus attachment protein $\sigma 1$ during proteolytic disassembly of virions is determined by a sequence polymorphism in the $\sigma 1$ neck. *Journal of Virology* 72, 8205–8213.
- Clark, K.M., Wetzel, J.D., Gu, Y., Ebert, D.H., McAbee, S.A., Stoneman, E.K., Baer, G.S., Zhu, Y., Wilson, G.J., Prasad, B.V., Dermody, T.S., 2006. Reovirus variants selected for resistance to ammonium chloride have mutations in viral outer-capsid protein $\sigma 3$. *Journal of Virology* 80, 671–681.
- Clarke, P., Meintzer, S.M., Widmann, C., Johnson, G.L., Tyler, T.S., 2001. Reovirus infection activates JNK and the JNK-dependent transcription factor c-Jun. *Journal of Virology* 75, 11275–11283.
- Coffey, M.C., Strong, J.E., Forsyth, P.A., Lee, P.W.K., 1998. Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway. *Science* 282, 1332–1334.
- Coffey, C.M., Sheh, A., Kim, I.S., Chandran, K., Nibert, M.L., Parker, J.S.L., 2006. Reovirus outer capsid $\mu 1$ induces apoptosis and associates with lipid droplets, endoplasmic reticulum, and mitochondria. *Journal of Virology* 80, 8422–8438.
- Collette, J., Ulku, A.S., Der, C.J., Jones, A., Erickson, A.H., 2004. Enhanced cathepsin L expression is mediated by different Ras effector pathways in fibroblasts and epithelial cells. *International Journal of Cancer* 112, 190–199.
- 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. *Biochemistry and Cell Biology* 71, 81–85.

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

Danis, C., Mabrouk, T., Faure, M., Lemay, G., 1997. Interferon has no protective effect during acute or persistent reovirus infection of mouse SC1 fibroblasts. *Virus Research* 51, 139–149.

Danthi, P., Guglielmi, K.M., Kirchner, E., Mainou, B., Stehle, T., Dermody, T.S., 2010. From touchdown to transcription: the reovirus cell entry pathway. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 343, 91–119.

Dermody, T.S., Nibert, M.L., Bassel-Duby, R., Fields, B.N., 1990. A $\sigma 1$ region important for hemagglutination by serotype 3 reovirus strains. *Journal of Virology* 64, 5173–5176.

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

Dermody, T.S., 1998. Molecular mechanisms of persistent infection by reovirus. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 233, 1–22.

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

- 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). *Journal of Virology* 2, 955–961.
- Dilakyan, E.A., Zhurbitskaya, V.A., Vinokurova, S.V., Gureeva, T.A., Lubkova, O.N., Topol, L.Z., Kisseljov, F.L., Solovyeva, N.I., 2001. Expression of cathepsin L and its endogenous inhibitors in immortal and transformed fibroblasts. *Clinica Chimica Acta* 309, 37–43.
- Ebert, D.H., Wetzel, J.D., Brumbaugh, D.E., Chance, S.R., Stobie, L.E., Baer, G.S., Dermody, T.S., 2001. Adaptation of reovirus to growth in the presence of protease inhibitor E64 segregates with a mutation in the carboxy terminus of viral outer-capsid protein sigma3. *Journal of Virology* 75, 3197–3206.
- Ebert, D.H., Deussing, J., Peters, C., Dermody, T.S., 2002. Cathepsin L and cathepsin B mediate reovirus disassembly in murine fibroblast cells. *Journal of Biological Chemistry* 277, 24609–24617.
- Emeny, J.M., Morgan, M.J., 1979. Regulation of the interferon system: evidence that Vero cells have a genetic defect in interferon production. *Journal of General Virology* 43, 247–252.
- Giantini, M., Shatkin, A.J., 1989. Stimulation of chloramphenicol acetyltransferase mRNA translation by reovirus capsid polypeptide sigma 3 in cotransfected COS cells. *Journal of Virology* 63, 2415–2421.
- Golden, J.W., Linke, J., Schmechel, S., Thoemke, K., Schiff, L.A., 2002. Addition of exogenous protease facilitates reovirus infection in many restrictive cells. *Journal of Virology* 76, 7430–7443.
- Golden, J.W., Bahe, J.A., Lucas, W.T., Nibert, M.L., Schiff, L.A., 2004. Cathepsin S

supports acid-independent infection by some reoviruses. *Journal of Biological Chemistry* 279, 8547–8557.

Golden, J.W., Schiff, L.A., 2005. Neutrophil elastase, an acid-independent serine protease, facilitates reovirus uncoating and infection in U937 promonocyte cells. *Virology Journal* 2, 48–62.

Guglielmi, K.M., Johnson, E.M., Stehle, T., Dermody, T.S., 2006. Attachment and cell entry of mammalian orthoreovirus. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 309, 1–38.

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 Review* 21, 91–98.

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.

Hiwasa, T., Kominami, E., 1995. Physical association of Ras and cathepsins B and L in the conditioned medium of v-Ha-ras-transformed NIH3T3 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 216, 828–834.

Hrdy, D.B., Rubin, D.H., Fields, B.N., 1982. Molecular basis of reovirus neurovirulence: role of the M2 gene in avirulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79, 1298–1302.

Huisman, H., Joklik, W.K., 1976. Reovirus-coded polypeptides in infected cells: isolation of two native monomeric polypeptides with affinity for single-stranded and double-stranded RNA, respectively. *Virology* 70, 411–424.

- Imani, F., Jacobs, B.L., 1988. Inhibitory activity for the interferon-induced protein kinase is associated with the reovirus serotype 1 sigma 3 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 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 μ 2 determines repression of interferon signaling and modulates myocarditis. *Journal of Virology* 86, 2302–2311.
- Johnson, E.M., Doyle, J.D., Wetzel, J.D., McClung, R.P., Katunuma, N., Chappell, J.D., Washington, M.K., Dermody, T.S., 2009. Genetic and pharmacologic alteration of cathepsin expression influences reovirus pathogenesis. *Journal of Virology* 83, 9630–9640.
- Joseph, L., Lapid, S., Sukhatme, V., 1987. The major ras induced protein in NIH3T3 cells is cathepsin L. *Nucleic Acids Research* 15, 3186.
- Kelly, K., Nawrocki, S., Mita, A., Coffey, M., Giles, F.J., Mita, M., 2009. Reovirus-based therapy for cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy* 9, 817–830.
- Kim, K., Cai, J., Shuja, S., Kuo, T., Murnane, M.J., 1998. Presence of activated ras correlates with increased cysteine proteinase activities in human colorectal carcinomas. *International Journal of Cancer* 79, 324–333.
- Kim, M., Chung, Y.H., Johnston, R.N., 2007. Reovirus and tumor oncolysis. *Journal of Microbiology* 45, 187–192.
- Kim, M., Williamson, C. T., Prudhomme, J., Bebb, D. G., Riabowol, K., Lee, P. W., Lees-Miller, S. P., Mori, Y., Rahman, M. M., McFadden, G., Johnston, R.N., 2010. The viral tropism of two distinct oncolytic viruses, reovirus and myxoma

virus, is modulated by cellular tumor suppressor gene status. *Oncogene* 29, 3990–3996.

Kim, M., Garant, K. A., zur Nieden, N. I., Alain, T., Loken, S. D., Urbanski, S. J., Forsyth, P. A., Rancourt, D. E., Lee, P. W., Johnston, R.N., 2011. Attenuated reovirus displays oncolysis with reduced host toxicity. *British Journal of Cancer* 104, 290–299.

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.

Lal, R., Harris, D., Postel-Vinay, S., de Bono, J., 2009. Reovirus: Rationale and clinical trial update. *Current Opinion in Molecular Therapeutics* 11, 532–539.

Lemay, G., 2011. Inverse genetics in the study of reoviruses: progress, obstacles and future developments (in French). *Virologie* 15, 53–62.

Lemay, G., Tumilasci, V., Hiscott, J., 2007. Uncoating reo: uncovering the steps critical for oncolysis. *Molecular Therapy* 15, 1406–1407.

Lemieux, R., Lemay, G., Millward, S., 1987. The viral protein sigma 3 participates in translation of late viral mRNA in reovirus-infected L cells. *Journal of Virology* 61, 2472–2479.

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

- Lloyd, R.M., Shatkin, A.J., 1992. Translational stimulation by reovirus polypeptide sigma 3: substitution for VAI RNA and inhibition of phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2. *Journal of Virology* 66, 6878–6884.
- Marcato, P., Shmulevitz, M., Pan, D., Stoltz, D., Lee, P.W., 2007. Ras transformation mediates reovirus oncolysis by enhancing virus uncoating, particle infectivity, and apoptosis-dependent release. *Molecular Therapy* 15, 1522–1530.
- Meanger, J., Wickramasinghe, R., Enriquez, C.E., Wilcox, G.E., 1999. Tissue tropism of avian reoviruses is genetically determined. *Veterinary Research* 30, 523–529.
- Middleton, J.K., Agosto, M.A., Severson, T.F., Yin, J., Nibert, M.L., 2007. Thermostabilizing mutations in reovirus outer-capsid protein mu1 selected by heat inactivation of infectious subvirion particles. *Virology* 361, 412–425.
- Montgomery, L.B., Kao, C.Y., Verdin, E., Cahill, C., Maratos-Flier, E., 1991. Infection of a polarized epithelial cell line with wild-type reovirus leads to virus persistence and altered cellular function. *Journal of General Virology* 72, 2939–2946.
- Nibert, M.L., Chappell, J.D., Dermody, T.S., 1995. Infectious subvirion particles of reovirus type 3 Dearing exhibit a loss in infectivity and contain a cleaved sigma 1 protein. *Journal of Virology* 69, 5057–5067.
- Nygaard, R.M., Golden, J.W., Schiff, L.A., 2012. Impact of host proteases on reovirus infection in the respiratory tract. *Journal of Virology* 86, 1238–1243.
- Park, E.H., Cho, I.R., Srisuttee, R., Min, H.J., Oh, M.J., Jeong, Y.J., Jhun, B.H., Johnston, R.N., Lee, S., Koh, S.S., Chung, Y.H., 2010. CUG2, a novel oncogene confers reoviral replication through Ras and p38 signaling pathway. *Cancer Gene Therapy* 17, 307–314.

- Reiter, D.M., Frierson, J.M., Halvorson, E.E., Kobayashi, T., Dermody, T.S., Stehle, T., 2011. Crystal structure of reovirus attachment protein $\sigma 1$ in complex with sialylated oligosaccharides. *Public Library of Science Pathogens* 7, e1002166.
- Rodgers, S.E., Barton, E.S., Oberhaus, S.M., Pike, B., Gibson, C.A., Tyler, K.L., Dermody, T.S., 1997. Reovirus-induced apoptosis of MDCK cells is not linked to viral yield and is blocked by Bcl-2. *Journal of Virology* 71, 2540–2546.
- Roner, M.R., Mutsoli, C., 2007. The use of monoreassortants and reverse genetics to map reovirus lysis of a ras-transformed cell line. *Journal of Virological Methods* 139, 132–142.
- Rudd, P., Lemay, G., 2005. Correlation between interferon sensitivity of reovirus isolates and ability to discriminate between normal and Ras-transformed cells. *Journal of General Virology* 86, 1489–1497.
- Samuel, C.E., 1998. Reoviruses and the interferon system. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 233(Pt 2), 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 Research*, 173 (2), 327-335.
- Schelling, P., Campbell, J.A., Stehle, T., Dermody, T.S., 2008. Structural basis of mammalian orthoreovirus cell attachment, in: Patton, J.T. (Ed.), *Segmented Double-Stranded RNA Viruses: Structure and Molecular Biology*. Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp. 147–171.
- Schiff, L.A., 1998. Reovirus capsid proteins sigma 3 and mu1: interactions that influence viral entry, assembly, and translational control. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 233, 167–183.

- 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.
- Schiff, L.A., Nibert, M.L., Tyler, K.L., 2007. Orthoreoviruses and their replication. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. et al., (Eds.), *Fields Virology*, 5th ed. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 1853–1915.
- Schmechel, S., Chute, M., Skinner, P., Anderson, R., Schiff, L., 1997. Preferential translation of reovirus mRNA by a sigma3-dependent mechanism. *Virology* 232, 62–73.
- Shepard, D.A., Ehnstrom, J.G., Skinner, P.J., Schiff, L.A., 1996. Mutations in the zinc-binding motif of the reovirus capsid protein $\sigma 3$ eliminate its ability to associate with capsid protein mu 1. *Journal of Virology* 70, 2065–2068.
- Sherry, B., 2009. Rotavirus and reovirus modulation of the interferon response. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 29, 559–567.
- Shmulevitz, M., Pan, L.Z., Garant, K., Pan, D., Lee, P.W., 2010. Oncogenic Ras promotes reovirus spread by suppressing IFN-beta production through negative regulation of RIG-I signaling. *Cancer Research* 70, 4912–4921.
- Shmulevitz, M., Gujar, S.A., Ahn, D.G., Mohamed, A., Lee, P.W.K., 2012. Reovirus variants with mutations in S1 and L2 genome segments exhibit enhanced virion infectivity and superior oncolysis. *Journal of Virology* 86, 7403–7413.
- Smakman, N., van den Wollenberg, D.J.M., Borel Rinkes, I.H.M., Hoeben, R.C., Kranenburg, O., 2005. Sensitization to apoptosis underlies KrasD12-dependent oncolysis of murine C26 colorectal carcinoma cells by reovirus T3D. *Journal of*

Virology 79, 14981–14985.

- Strong, J.E., Lee, P.W., 1996. The v-erbB oncogene confers enhanced cellular susceptibility to reovirus infection. *Journal of Virology* 70, 612–616.
- 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. *The EMBO Journal* 17, 3351–3362.
- Taber, R., Alexander, V., Whitford, W., 1976. Persistent reovirus infection of CHO cells resulting in virus resistance. *Journal of Virology* 17, 513–524.
- Tyler, K.L., Squier, M.K.T., Brown, A.L., Pike, B., Willis, D., Oberhaus, S.M., Dermody, T.S., Cohen, J., 1996. Linkage between reovirus-induced apoptosis and inhibition of cellular DNA synthesis: role of the S1 and M2 genes. *Journal of Virology* 70, 7984–7991.
- Urbanelli, L., Trivelli, F., Ercolani, L., Sementino, E., Magini, A., Tancini, B., Franceschini, R., Emiliani, C., 2010. Cathepsin L increased level upon Ras mutants expression: the role of p38 and p44/42 MAPK signaling pathways. *Molecular and Cellular Biochemistry* 343, 49–57.
- van den Wollenberg, D.J., van den Hengel, S.K., Dautzenberg, I.J., Kranenburg, O., Hoeben, R.C., 2009. Modification of mammalian reoviruses for use as oncolytic agents. *Expert Opinion on Biological Therapy* 9, 1509–1520.
- 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. *Public Library of Science One* 7, e48064.

- Verdin, E.M., Maratos-Flier, E., Carpentier, J.L., Kahn, C.R., 1986. Persistent infection with a nontransforming RNA virus leads to impaired growth factor receptors and response. *Journal of Cellular Physiology* 128, 457–465.
- 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. *Journal of Virology* 65, 6772–6781.
- Wetzel, J.D., Chappell, J.D., Fogo, A.B., Dermody, T.S., 1997a. Efficiency of viral entry determines the capacity of murine erythroleukemia cells to support persistent infections by mammalian reoviruses. *Journal of Virology* 71, 299–306.
- Wetzel, J.D., Wilson, G.J., Baer, G.S., Dunnigan, L.R., Wright, J.P., Tang, D.S., Dermody, T.S., 1997b. Reovirus variants selected during persistent infections of L cells contain mutations in the viral S1 and S4 genes and are altered in viral disassembly. *Journal of Virology* 71, 1362–1369.
- Wilson, G.J., Nason, E.L., Hardy, C.S., Ebert, D.H., Wetzel, J.D., Venkataram Prasad, B.V., Dermody, T.S., 2002. A single mutation in the carboxy terminus of reovirus outer-capsid protein sigma 3 confers enhanced kinetics of sigma 3 proteolysis, resistance to inhibitors of viral disassembly, and alterations in sigma 3 structure. *Journal of Virology* 76, 9832–9843.
- Yue, Z., Shatkin, A.J., 1997. Double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) is regulated by reovirus structural proteins. *Virology* 234, 364–371.
- Zhang, X., Ji, Y., Zhang, L., Harrison, S.C., Marinescu, D.C., Nibert, M.L., Baker, T.S., 2005. Features of reovirus outer capsid protein mu1 revealed by electron cryomicroscopy and image reconstruction of the virion at 7.0 Angstrom resolution. *Structure* 13, 1545–1557.

5.1.9 Tables and figures

Tableau II : (Table 1). Amino acids substitutions in the three outer capsid proteins observed in viruses obtained from different persistently-infected cell lines.

	$\sigma 1$	$\sigma 3$	$\mu 1$
Vero ¹	Q78P; N198K	None	E89G; A114V
L929 ²	Many	Y354H	Not determined
HT1080 ³	L116P; V127A; Q251stop	S177F; H251L	Not determined
Raji ³	None	H251L	Not determined
CA46 ³	K26T	H230Y; S233L; N353Q; Y354H	Not determined
SC1 ⁴	None	S177F	None
CT26 ⁴	K26T	None	E73D; L457F

Amino acids substitutions observed in viruses recovered from different persistently infected cell lines as described in the text. ¹This study. ²Dermody, 1998. ³Kim et al., 2011. ⁴Unpublished data.

Tableau III : (Table 2). Amino acids substitutions in the $\mu 1$ protein of Vero-AV and ten independent clones obtained from PCR-amplified fragment

	81	87	89	114	120	21
Wild-type	N	P	E	A	F	M
Vero-AV	N	P	G	V	F	M
Clone 1	N	P	G	V	F	M
Clone 2	N	S	E	V	F	T
Clone 3	D	P	G	A	F	M
Clone 4	N	P	G	V	S	M
Clone 5	N	P	G	V	F	M
Clone 6	N	P	G	V	F	M
Clone 7	N	S	E	A	F	M
Clone 8	N	P	G	V	F	M
Clone 9	N	P	G	V	F	M
Clone 10	N	P	G	V	F	M

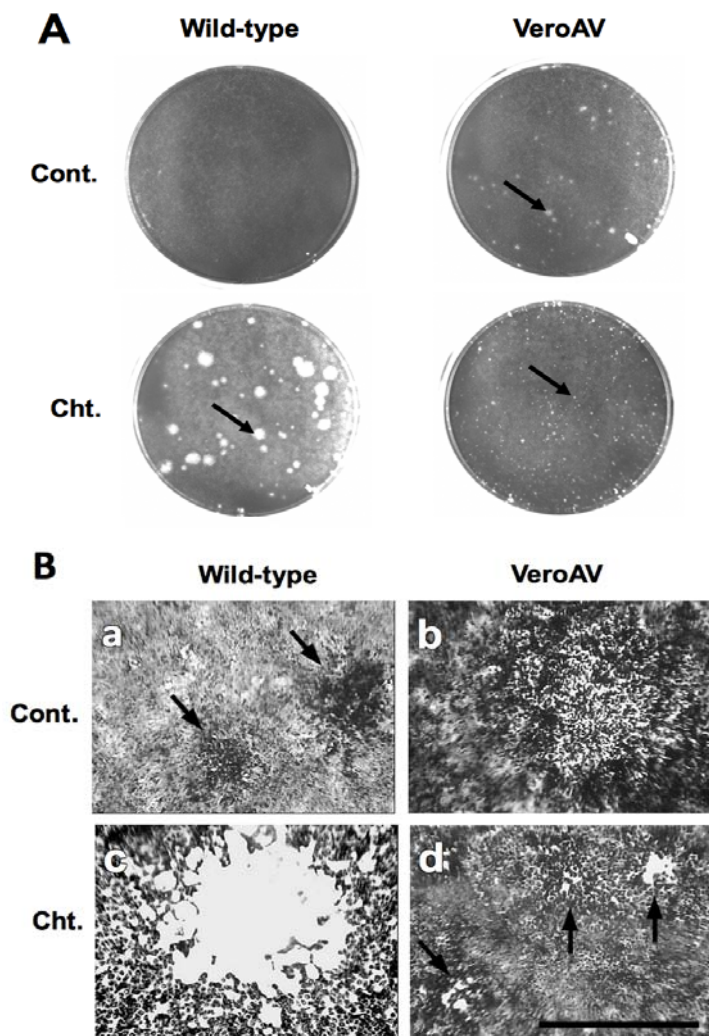


Fig. 1. Plaque formation by VeroAV.

Plaque assay was performed on Vero cells in the presence (Cht.) or absence (Cont.) of chymotrypsin, as described in Section 2. (A) A single well presenting single-well plaques, in the presence or absence of chymotrypsin using the same amount of virus inoculum, are presented for the wild-type virus and VeroAV. Cell monolayers were fixed and stained at either 5 days post-infection in the absence of chymotrypsin or 4 days post-infection when chymotrypsin was present. Arrows point to representative plaques observed for the wild-type virus in the presence of chymotrypsin and for VeroAV in absence and presence of chymotrypsin. (B) Closer examination of stained plaques was done under an inverted microscope using a low magnification, 4x, objective; arrows point to representative plaques in panel a and d. Bar is 0.5 mm.

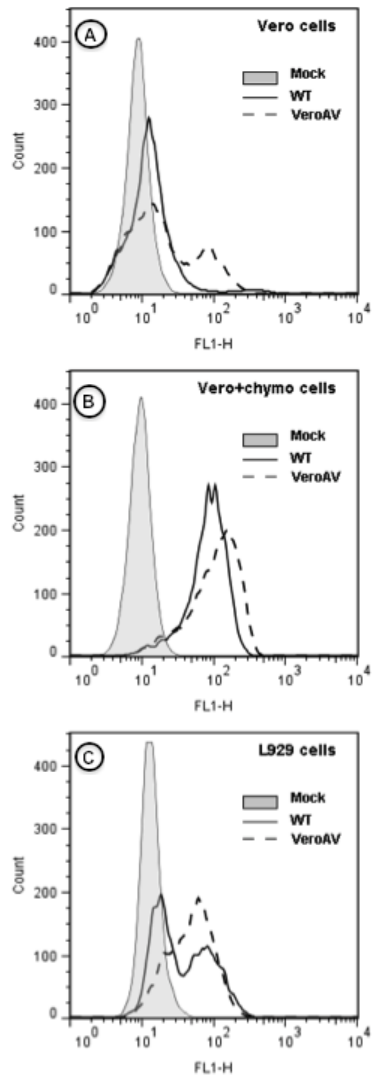


Fig. 2. Efficiency of infection by VeroAV determined by FACS analysis.

Vero cells (panel A and B) or L929 cells (panel C) were infected at a MOI of 5 with either wild-type virus (WT) or VeroAV, as indicated. The cells were recovered 24 h post-infection and analyzed by FACS for detection of intracellular reovirus antigens, as described in Section 2. Mock-infected cells were similarly processed and incubated with the fluorescent antibody (filled in pale gray). In panel B, chymotrypsin was added for infection of Vero cells, as described in Section 2.

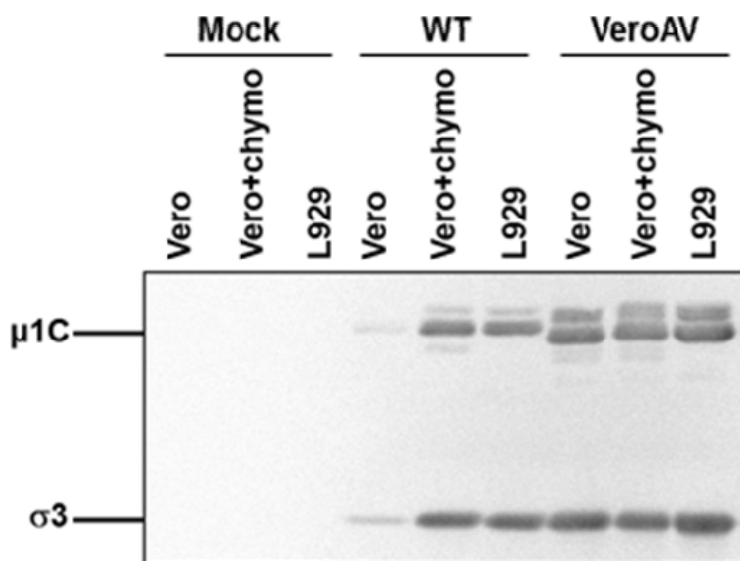


Fig. 3. Synthesis of viral protein in VeroAV-infected cells.

Vero cells or L929 cells were infected with either wild-type virus (WT) or VeroAV at a MOI of 5, as indicated. Proteins were recovered at 24 h post-infection and analyzed for the presence of viral proteins by immunoblotting, as described in Section 2; positions of the two major outer capsid proteins, $\sigma 3$ and $\mu 1C$, are indicated.

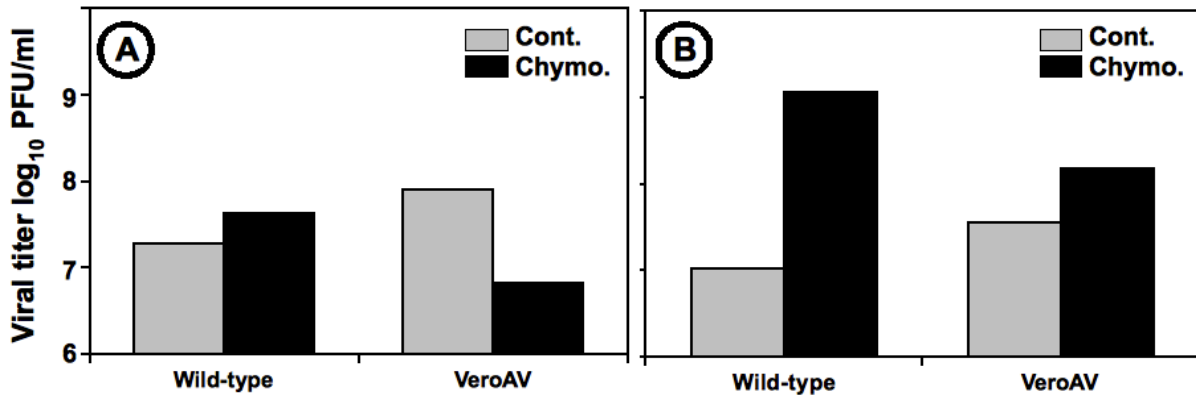


Fig. 4. Production of infectious virus in VeroAV-infected cells.

Vero cells were infected with either wild-type or VeroAV at a MOI of 5 in the presence (dark bar) or absence of 20 μ g/ml of chymotrypsin, frozen 24 h post-infection and virus titers were determined (panel A). In panel B, the same experiment was performed except that medium was changed 4 h post-adsorption to remove chymotrypsin and heat-inactivated fetal bovine serum was added.

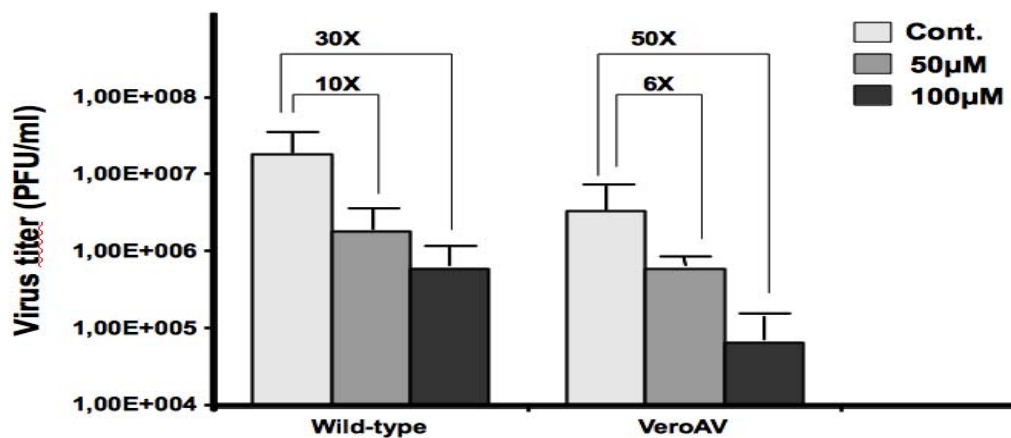


Fig. 5. Sensitivity of VeroAV to lysosomal protease inhibitor.

L929 cells were infected with either wild-type or VeroAV at a MOI of 2 in the absence or presence of E64 at a concentration of 50 or 100 µM, as indicated. Infected cells were frozen 24 h post-infection and virus titers were determined. Results are presented as the average of two separate experiments, error bars represent standard error of the mean.

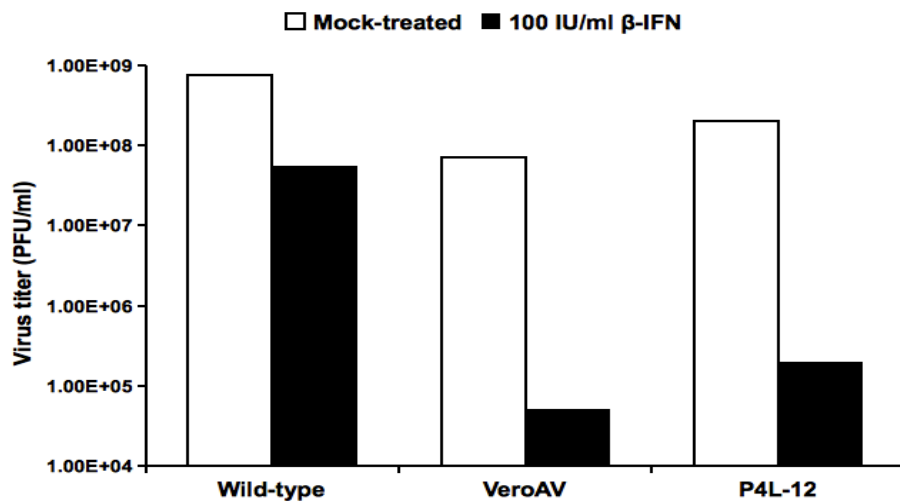


Fig. 6. Sensitivity of VeroAV to interferon.

L929 cells were used to titer the wild-type parental reovirus, VeroAV or the interferon-hypersensitive P4L-12 isolate, using serial tenfold dilution in the TCID₅₀ method, in the absence or presence of murine β -interferon at 100 international units (IU)/ml, as described in Section 2.

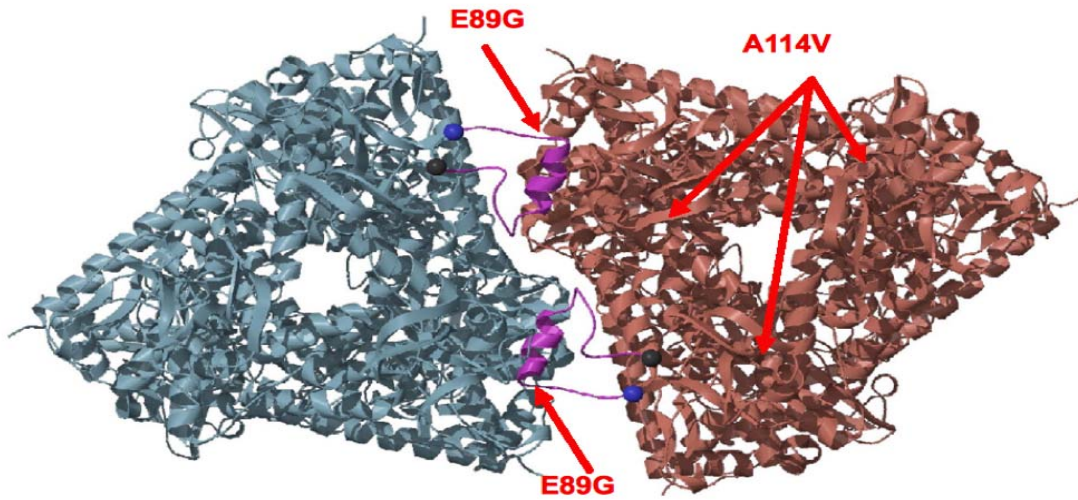


Fig. 7. Positions of amino acids substitutions on $\mu 1$ structure.

The structure of the two adjacent $\mu 1$ trimers is presented from below with arrows pointing at the position of E89 and A114 amino acids harboring substitutions on VeroAV; Figure adapted from **Zhang et al., (2005)**, with permission from Elsevier.

5.2 Caractérisation par génétique inverse de VeroAV

Dans un deuxième article, nous voulions approfondir nos études sur ce mutant unique qu'est le VeroAV. L'article en question s'intitule « **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) 22 January 2015, Pages 20–29 (Sandekian and Lemay, 2015).

Étant donné la nature des substitutions d'acides aminés sur la protéine $\sigma 1$, nous voulions savoir si la fixation aux acides sialiques était affectée pour ce virus. Les résultats démontrent qu'effectivement, VeroAV se fixe mieux sur les cellules L929, mais surtout sur les cellules Vero comparativement au virus de type sauvage. Aussi, un traitement à la neuraminidase, qui dégrade les acides sialiques présents à la surface cellulaire, affecte négativement la fixation de VeroAV. Nous avons également noté que le désassemblage semble être altéré sur VeroAV comparativement au virus de type sauvage. Grâce à la technique de génétique inverse, des virus comportant des substitutions d'acides aminés sur $\sigma 1$, $\mu 1$ ou les deux ont été créés. Nous avons pu démontrer que l'adaptation aux cellules Vero est principalement due aux substitutions présentes sur $\sigma 1$, quoique la nature des résidus sur $\mu 1$ puisse affecter ce phénotype.

Contribution des auteurs:

J'ai construit les virus mutants et j'ai effectué toutes les expériences. J'ai contribué à la création de figures et tableaux et ainsi qu'à la révision du manuscrit.

5.2.1 Research highlights

▶ A Vero cell-adapted reovirus bypasses prior uncoating to infect Vero cells. ▶ The Vero cell-adapted virus exhibits increased binding onto cell surface sialic acids. ▶ The Vero cell-adapted virus also exhibits altered kinetics of viral disassembly. ▶ Amino acid substitutions in $\sigma 1$ are mostly responsible for adaptation to Vero cells. ▶ Co-adaptation of $\mu 1$ is necessary for $\sigma 1$ function.

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

Véronique Sandekian and Guy Lemay*

*Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, Canada
H3C 3J7*

*Corresponding author: Tel: +1 514 343 2422
 Fax: +1 514 343 5701
 Email address: (G. Lemay)
 Département de Microbiologie, Infectiologie et
Immunologie
 Pavillon Roger-Gaudry, Université de Montréal
 P.O. Box 6128, Station Centre-ville
 Montréal (Québec), Canada H3C 3J7

Running title: Reovirus adaptation to Vero cells

5.2.2 Abstract

In a recent study, the serotype 3 Dearing strain of mammalian orthoreovirus was adapted to Vero cells; cells that exhibit a limited ability to support the early steps of reovirus uncoating and are unable to produce interferon as an antiviral response upon infection. The Vero cell-adapted virus (VeroAV) exhibits amino acids substitutions in both the $\sigma 1$ and $\mu 1$ outer capsid proteins but no changes in the $\sigma 3$ protein. Accordingly, the virus was shown not to behave as a classical uncoating mutant. In the present study, an increased ability of the virus to bind at the Vero cell surface was observed and is likely associated with an increased ability to bind onto cell-surface sialic acid residues. In addition, the kinetics of $\mu 1$ disassembly from the virions appears to be altered. The plasmid-based reverse genetics approach confirmed the importance of $\sigma 1$ amino acids substitutions in VeroAV's ability to efficiently infect Vero cells, although $\mu 1$ co-adaptation appears necessary to optimize viral infection. This approach of combining *in vitro* selection of reoviruses with reverse genetics to identify pertinent amino acids substitutions appears promising in the context of eventual reovirus modification to increase its potential as an oncolytic virus.

Keywords: Reovirus; Mutants; Binding; Uncoating; Sigma1; Mu1

5.2.3 Introduction (Section 1)

Mammalian orthoreoviruses, hereafter referred to as “reovirus”, are prototype members of the *Orthoreovirus* genus in the *Reoviridae* family. These viruses are generally cytolytic as they kill and lyse infected cells in culture; this has been generally attributed to apoptosis (reviewed in: Clarke et al., 2005; Danthi et al., 2010), although both necrotic (Berger and Danthi, 2013) and autophagic (Thirukkumaran et al., 2013) cell death likely occurs in certain cell types.

In the last few years, there has been renewed interest in the study of these viruses, given their ability to discriminate between normal and transformed/cancer cells, specifically infecting and killing the latter and giving rise to the idea of using them as “oncolytic viruses”. This has led to numerous clinical studies as reviewed by others (Black and Morris, 2012; Clements et al., 2014; Harrington et al., 2010; Kelly et al., 2009; Maitra et al., 2012). Despite the fact that reoviruses are naturally oncolytic without prior genetic modifications, there is still a significant research effort ongoing to obtain novel virus variants better adapted to infect, replicate in, and kill cancer cells while sparing non-transformed cells (van den Hengel et al., 2013; Kim et al., 2011; Rudd and Lemay, 2005; Shmulevitz et al., 2012; van den Wollenberg et al., 2009, 2012). One possible approach is to take advantage of novel viral variants that could be selected during establishment of viral persistence in different cell types.

Although reoviruses are considered to be essentially cytolytic, there have been numerous reports of persistence establishment with these viruses upon long-term cultivation of infected cells (reviewed in: Dermody, 1998). Since constant viral reinfection is needed to maintain the infected state, this has led to the identification of viral mutants, but few of those have been well characterized. In the most-studied L929 cell model, various amino acid substitutions were found in the viral $\sigma 1$ protein and a single amino acid substitution in $\sigma 3$ (Y354H); both proteins being part of the outer capsid of the virion. The $\sigma 3$ -Y354H substitution was later shown to be most important for the ability of the virus to be maintained in persistently infected cells (Baer and Dermody, 1997; Ebert et al., 2001; Wetzel et al., 1997; Wilson et al., 2002). This amino acid

substitution is located at the surface-exposed lobe of the $\sigma 3$ outer capsid protein, thus increasing the protein's sensitivity to proteases and favoring viral uncoating under conditions where proteases are present in limiting amount (Baer and Dermody, 1997; Wetzel et al., 1997). In more recent studies, amino acid substitutions in $\sigma 3$ were again observed in viruses recovered from Raji, HT1080 and CA46 cells, at positions consistent with an increased uncoating of these viruses; substitutions in $\sigma 1$ were also found in two of these viruses (Kim et al., 2011).

In the most recent study on reovirus persistence (Jabre et al., 2013), a novel variant of reovirus serotype 3 Dearing (T3/Human/Ohio/Dearing/55), named Vero cell-adapted virus (VeroAV) was obtained by long-term culture of the virus on these cells that were previously shown to be somewhat resistant to a wild-type virus, due to their reduced ability to uncoat the virus (Golden et al., 2002). Prior treatment with chymotrypsin, uncoating virions to “infectious subviral particles” (ISVPs), significantly augmented infection by a wild-type virus while VeroAV exhibits an increased ability to infect Vero cells even in the absence of prior uncoating by chymotrypsin treatment. Surprisingly, VeroAV did not behave as an uncoating mutant, still showing normal sensitivity to inhibitors of lysosomal cathepsins, in contrast with uncoating mutants selected during viral persistence in L929 cells (Baer and Dermody, 1997; Wilson et al., 2002). Accordingly, VeroAV does not harbor amino acid substitutions in its $\sigma 3$ protein (Jabre et al., 2013). However, two amino acids substitutions were found in each of the $\sigma 1$ and $\mu 1$ outer capsid proteins (Jabre et al., 2013), at positions consistent with an altered binding to host cell surface or outer capsid disassembly (Reiter et al., 2011; Zhang et al., 2005), but this was not further studied at the time.

The $\sigma 1$ protein forms the surface-exposed spikes at the surface of the virion and binds to both sialic acid and the JAM receptor at the cell surface (Danthi et al., 2010; Dermody et al., 2013), $\sigma 1$ is also retained in infectious subviral particles (ISVPs) that are generated by proteolytic cleavage of the outer capsid proteins; in fact, reovirus uncoating has been shown to increase the binding of the resulting ISVPs to the cell surface (Chappell et al., 1998; Nibert et al., 1995). The proteolytic cleavage of the outer capsid, referred to as “uncoating”, takes place in endosomes following endocytosis of the viral particles or in the extracellular milieu where proteases are present. Uncoating can also be

achieved in the laboratory by chymotrypsin treatment of virions and this facilitates infection of certain cell types, such as the Vero cells used in the present study, that are inefficient in their ability to uncoat the virus (Golden et al., 2002). During uncoating, the $\sigma 3$ protein is first removed, followed by proteolytic cleavage of the $\mu 1$ protein, allowing the viral particles to cross the cellular or endosomal membrane (Danthi et al., 2010; Dermody et al., 2013). Together, the three outer capsid proteins $\sigma 1$, $\sigma 3$ and $\mu 1$, are thus critical in infectivity of the viral particles and initiation of the viral replication cycle.

In the present study, the importance of the $\sigma 1$ and $\mu 1$ amino acids substitutions of VeroAV was thus further examined. The virus was first shown to exhibit an increased binding at the surface of Vero cells likely due to an increased binding to cell-surface sialic acid residues. An altered disassembly of its outer capsid, as evidenced by different kinetics of *in vitro* cleavage by chymotrypsin, was also observed. The novel plasmid-based reverse genetics system (Kobayashi et al., 2007, 2010; reviewed in: Boehme et al., 2011; van den Hengel et al., 2013; Lemay, 2011) then allowed to establish that the preferential infection of Vero cells is actually due to the $\sigma 1$ amino acids substitutions, although the co-adaptation of $\mu 1$ appears necessary to optimize viral infection. Altogether, these results indicate that the establishment of viral persistence can select for different viral variants depending on the cell type. Combined with the analytical tool of reverse genetics, this could allow for the optimization of selective reovirus infection of different cell types.

5.2.4 Materials and methods (Section 2)

5.2.4.1 Cell lines and viruses

L929, HeLa and Vero cells were originally obtained from the American type culture collection (ATCC); the BHK cells stably expressing the T7 RNA polymerase have been described (Buchholz et al., 1999) and were a generous gift from the laboratory of Dr. John Hiscott (Lady Davis Research Institute, Montréal, Canada). All cells were grown in

minimal Eagle medium (MEM) with 5% fetal bovine serum. Wild-type reovirus laboratory stock (T3D^S) was derived from a pure plaque of reovirus type 3 Dearing (T3/Human/Ohio/Dearing/55) and propagated at low multiplicity of infection on L929 cells. The original inoculum was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Vero cell-adapted reovirus (VeroAV) was obtained following long-term culture of the wild-type virus on Vero cells (Jabre et al., 2013) and propagated on HeLa cells.

5.2.4.2 Antibodies

Hybridoma cell lines producing either anti- σ 3 (4F2) or anti- μ 1 (10F6) have been described (Virgin et al., 1991) and were obtained from Dr. Kevin Coombs (University of Manitoba). Cells were grown in MEM for suspension culture with 10% fetal bovine serum, proline (20 μ g/ml) and β -mercaptoethanol (50 μ M) and antibodies were recovered, as previously described (Brochu-Lafontaine and Lemay, 2012). The polyclonal antiserum directed against the carboxyl-terminal head domain of σ 1 was produced originally in the laboratory of Dr. Terence Dermody (Vanderbilt University, Tennessee) and was a generous gift from Dr. Earl Brown (University of Ottawa). The rabbit anti-tubulin antiserum was obtained from ICN Biomedicals Inc.

5.2.4.3 Determination of virus titer

Virus titers were determined by TCID₅₀ method on L929 cells in 96-wells plates (Danis and Lemay, 1993). For electron microscopy, infectious virus stocks were extracted once with Vertrel[®] XF (1,1,1,2,3,4,4,5,5,5-decafluoropentane; Miller-Stephenson Chemical company Inc.) (Mendez et al., 2000) to remove most cellular debris and mixed with latex beads at a known concentration. Processing of samples and microscopic observations were done at the INRS-Institut Armand Frappier (Laval, Québec) electron microscopy facilities.

5.2.4.4 Virus binding at the host-cell surface

Infectious viral particles at a MOI of 80 PFU/cell were allowed to bind onto the host-cell surface of L929 or Vero cells for 1 h at 4°C with occasional gentle agitation. Cells with bound virions were then extensively washed with cold medium and immediately frozen at – 80°C for virus titration. In some experiments, neuraminidase (from *Clostridium perfringens*, New England Biolabs) pretreatment was done at 37°C at a concentration of 50 units/ml in tissue culture medium for 1 h. Neuraminidase was then removed, cells were washed with medium, and binding of virions at 4°C was performed, as before.

5.2.4.5 *In vitro* cleavage of capsid proteins with chymotrypsin

Virions prepared by Vertrel extraction of viral stocks (propagated in the absence of serum) were incubated from 0 to 30 min at 10 or 40 µg/ml concentrations of chymotrypsin at 37°C or 28°C. Reactions were stopped by addition of 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and samples were analyzed by immunoblotting using either the combination of anti-µ1 and anti-σ3 monoclonal antibodies or the anti-σ1 polyclonal antiserum.

5.2.4.6 Immunoblotting

Infected cells were recovered by scraping in a small volume of medium and processed for immunoblotting, as previously described (Brochu-Lafontaine and Lemay, 2012). Images were obtained using either autoradiography on Kodak BioMax Light films or on a Typhoon Trio™ imager (GE Healthcare Life Sciences).

5.2.4.7 Plasmid constructs

The plasmids separately harboring each of the cDNA corresponding to the 10 genes of reovirus serotype 3 Dearing (T3D^K), under the transcriptional control of the T7 promoter, were previously described (Kobayashi et al., 2007) and were a generous gift

from the laboratory of Dr. Terence Dermody (Vanderbilt University, Nashville, Tennessee). To obtain the virus mutant harboring the amino acids substitutions of VeroAV in the defined background of the reverse genetics system, a fragment of the gene encompassing all mutations was obtained by RT-PCR amplification on the viral VeroAV genome, essentially as previously described (Brochu-Lafontaine and Lemay, 2012; Jabre et al., 2013). PCR fragments were recovered and subcloned to replace the corresponding fragment in the M2 or S1 reverse genetics plasmid. A similar strategy was used to construct a wild-type plasmid corresponding to the initial wild-type laboratory virus stock (T3D^S).

5.2.4.8 Rescue of infectious mutant viruses by reverse genetics

Small-scale preparations of endotoxin-free plasmid DNA, corresponding to the different M2 and S1 genes were column-purified as recommended by the manufacturer (Zyppy plasmid miniprep kit, Zymo Research). Recovery of infectious reovirus stocks by transfection of the baby hamster kidney (BHK) cell line constitutively expressing the T7 RNA polymerase (Buchholz et al., 1999) was done essentially as previously described (Brochu-Lafontaine and Lemay, 2012). The presence of the expected amino acids substitutions and absence of other mutations on the three genes encoding outer capsid proteins was verified by RT-PCR and sequencing of the corresponding fragment, as for the original VeroAV (Jabre et al., 2013).

5.2.4.9 Plaque assay

Plaque assays were performed on Vero cells in the presence of chymotrypsin (Sigma Type I-S from bovine pancreas) at 5µg/ml, as previously described (Brochu-Lafontaine and Lemay, 2012; Jabre et al., 2013).

5.2.5 Results (Section 3)

5.2.5.1 Binding of reovirus VeroAV at the cell surface

Considering the position of the amino acids substitutions on both $\sigma 1$ and $\mu 1$ of VeroAV, it was previously suggested that virus disassembly and/or binding could be affected by these changes (Jabre et al., 2013). This last point was first examined as a possible explanation for the increased ability of VeroAV to infect Vero cells.

Infectious virus stocks of either VeroAV or the original wild-type laboratory virus stock from which it was originally derived were thus prepared by infection of HeLa cells; this wild-type virus will be referred to as type 3 Dearing, isolate Sandekian (T3D^S) to distinguish it from other stocks of wild-type virus, as will be discussed later in the manuscript. VeroAV and T3D^S virus stocks were first compared to determine if they exhibit a similar particle/infectious titer ratio. The presence of similar numbers of T3D^S and VeroAV viral particles for the same viral titer was confirmed by quantitative electron microscopy using a latex bead standard (data not shown). Although somewhat variable from one preparation to another, the ratio of the number of virus particles to viral infectivity titer was approximately 100 particles/PFU for both viruses. This is, in fact, quite similar to previous reports by other groups (Bokiej and Dermody, 2012; Doyle et al., 2012; Frierson et al., 2012; Hand and Tamm, 1973; Mendez et al., 2000).

To directly determine their binding to the cell surface, virions were then adsorbed onto the cells. In a preliminary experiment, binding of the T3D^S virus was shown to increase linearly at all MOI tested, up to 250 (data not shown). This is not surprising considering that binding assay are routinely performed at 50,000 particles per cell by other investigators (for example Bokiej and Dermody, 2012). An intermediate MOI of 80 was thus used thereafter to avoid saturation of the cellular receptors. In these conditions, T3D^S bound to both L929 and Vero cells with essentially the same efficiency whereas the VeroAV virions showed more than fivefold increase in binding to Vero cells compared to the T3D^S virions (Fig. 1). Although VeroAV virions also apparently bind slightly better to the L929 cell surface, this difference was not statistically significant. The data rather

indicate that the increase in binding of VeroAV at the cell surface results from an adaption to binding preferentially onto these cells.

5.2.5.2 Binding of wild-type T3D^S and VeroAV virions to sialic acids

Considering the position of the amino acid substitutions observed in $\sigma 1$ of VeroAV (Table I), compared with wild-type T3D^S and wild-type reverse genetics virus (T3D-Kobayashi, T3D^K), an increased binding of the virions to sialic acids at the cell surface was postulated. Amino acid 198 is part of the sialic acid binding region of the protein, and is known to somehow contribute to the sialic binding property of the protein (Chappell et al., 1997; Dermody et al., 1990), although it does not appear to directly interact with the sugar moieties (Reiter et al., 2011).

In a preliminary experiment, the hemagglutination potential of VeroAV was examined as a first indication of binding to sialic acid (Chappell et al., 1997; Dermody et al., 1990). Semi-purified viral particles from either T3D^S or VeroAV were submitted to serial twofold dilutions and their ability to agglutinate bovine red blood cells was compared. At the concentrations used, hemagglutination could not be detected with the semi-purified T3D^S virions while, at the same protein concentration, hemagglutination was observed up to the 4th binary dilution with VeroAV. In this assay, when compared with cesium chloride-purified T3D^S virions, the hemagglutination potential of VeroAV is thus at least 8-fold higher than that of T3D^S (supplementary Fig. S1).

To further determine if the presence of sialic acid at the cell surface is involved in the increased binding of VeroAV to the surface of Vero cells, the cells were pre-treated with neuraminidase to remove cell surface sialic acids before virus binding. In preliminary experiments, the concentration of 50 units/ml appeared as optimal to see an effect on virus adsorption while minimizing host-cell toxicity (data not shown) this concentration was thus retained as experimental conditions. Although not considered statistically significant, an almost twofold increase in binding was found with T3D^S; this is somewhat reminiscent of the situation observed with some “sialidase-insensitive” rotavirus strains (Haselhorst et al. 2009). This was not further investigated but could be due to increased accessibility of other cellular receptors, either protein such as the JAM

receptor or other glycans, after terminal sialic acid removal by neuraminidase. In contrast, there was an almost threefold decrease in binding for VeroAV under the same conditions (Fig. 2). Altogether these results support the idea that increased binding of VeroAV at the surface of Vero cells depends on the presence of sialic acid residues at the cell surface.

5.2.5.3 Outer capsid disassembly of wild-type T3D^S and VeroAV virions

Considering the position of amino acid substitutions on $\mu 1$, there is also a possibility that its cleavage and outer capsid disassembly could be affected, as discussed previously (Jabre et al., 2013), and could thus affect the differential infectivity of the virus in the presence or absence of prior chymotrypsin treatment. To directly examine this possibility, virions were treated with 10 μ g/ml chymotrypsin *in vitro* for different times. As expected, removal of $\sigma 3$ was observed for both T3D^S and VeroAV, although apparently less efficiently for VeroAV. However, a striking difference was observed for $\mu 1$ that was gradually converted from $\mu 1C$ to δ for T3D^S while $\mu 1C$ of VeroAV gradually disappeared without concomitant accumulation of δ protein (Fig. 3, upper panel).

This kinetics of T3D^S disassembly is similar to that previously reported for serotype 1 Lang virus (T1L), while that of VeroAV resembles that of T3D^K (Madren et al., 2012; Sarkar and Danthi, 2010). This is not unexpected since the $\mu 1$ protein of T3D^S harbors a valine at position 305, as in T1L, while an alanine is found in other isolates of T3D such as T3D^K (Table I). This difference between T3D^K and T1L is responsible for their different disassembly kinetics (Madren et al., 2012). In contrast, although it harbors a valine at position 305, VeroAV behaves as T3D^K; this is most likely due to the additional amino acid substitutions at positions 89 and/or 114 (Jabre et al., 2013). Interestingly, while we were completing this work, it has been further established that the loop comprising amino acids 72–96 of $\mu 1$ is involved in stability of the outer capsid and affects its disassembly upon protease treatment. It is especially striking that glutamic acid 89 was found to be the most critical amino acid in this phenotype (Sarkar and Danthi, 2013).

The amount of $\sigma 1$ in the viral particles during gradual disassembly was also examined by immunoblotting. There was no apparent difference in the stability of the

protein in the viral capsid during disassembly (Fig. 3, lower panel); however, a significantly higher amount of $\sigma 1$ was found in VeroAV virions compared to T3D^S virions; as estimated by the ratio of $\sigma 1$ relative to $\sigma 3$, there appears to be approximately three times more $\sigma 1$ per viral particle for VeroAV compared to the T3D^S virions, raising the possibility that the amount of $\sigma 1$ in the viral particle, in addition to a difference in affinity for sialic acids, could be responsible for increased virus binding at the cell surface.

5.2.5.4 Rescue of virus mutants using plasmid-based reverse genetics

To confirm that the amino acid substitutions in $\sigma 1$ and $\mu 1$ are responsible for T3D adaptation to Vero cells and to explore whether amino acid substitutions on both proteins are required, the fragments encompassing the substitutions of VeroAV compared to T3D^S were obtained by RT-PCR on the viral genomic dsRNA and used to substitute the homologous fragment in the corresponding gene of T3D^K used for plasmid-based reverse genetics (Kobayashi et al., 2007).

These plasmid constructs could then be used to generate a mutant virus harboring the amino acid substitutions of VeroAV $\sigma 1$ (protein referred hereafter as $\sigma 1$ -AV), including those differences between T3D^S and T3D^K that are also present in the same fragment. In parallel, the same procedure was applied to generate a plasmid harboring solely the three amino acid differences between T3D^S and T3D^K in this protein (proteins referred hereafter as $\sigma 1$ -S and $\sigma 1$ -K, respectively), in order to generate a control virus in a T3D^K background for all other viral proteins. A similar procedure was used for the M2 gene to introduce the fragment encompassing all amino acids changes on $\mu 1$ of VeroAV, including differences between T3D^S and T3D^K (protein hereafter referred to as $\mu 1$ -AV). These two amino acid differences between T3D^S and T3D^K were introduced in a separate plasmid to generate a control virus harboring the $\mu 1$ protein of T3D^S (hereafter referred to as $\mu 1$ -S) in a wild-type T3D^K background. The amino acid differences between T3D^K, T3D^S and VeroAV in both $\sigma 1$ and $\mu 1$ proteins are summarized in Table I.

The different plasmids were then used in the plasmid-based reverse genetics system to rescue viruses harboring amino acid substitutions in either $\sigma 1$, $\mu 1$ or both, in an

otherwise wild-type T3D^K background. All viruses were propagated before sequencing of the complete genes encoding $\sigma 1$, $\sigma 3$ and $\mu 1$ of the final virus stocks to confirm that they possessed the expected sequences.

For some viruses, the titers obtained upon viral propagation remained very low (Fig. 4). Interestingly, it appears that viruses produced with $\mu 1$ -K had higher titers than those with either $\mu 1$ -S or $\mu 1$ -AV except for the $\sigma 1$ -AV/ $\mu 1$ -AV combination. The worst combination was that of $\sigma 1$ -AV/ $\mu 1$ -S, strongly suggesting that $\mu 1$ -S had to evolve concomitantly with $\sigma 1$ -AV during selection of VeroAV.

5.2.5.5 Infectivity of rescued viruses in Vero cells

The different viruses were then analyzed for their relative ability to infect Vero cells in the presence or absence of chymotrypsin in a single-cycle assay, using immunoblotting. Two viruses, presenting poorly adapted protein combinations ($\sigma 1$ -K with $\mu 1$ -AV and $\sigma 1$ -AV with $\mu 1$ -S), and whose titers were reduced more than a thousandfold, were not examined.

As expected, viruses harboring either $\sigma 1$ -S/ $\mu 1$ -S or $\sigma 1$ -K/ $\mu 1$ -K wild-type combinations were poorly infectious on Vero cells in the absence of chymotrypsin while their infectivity was increased upon chymotrypsin treatment (Fig. 5), as with the original wild-type T3D^S virus. The combination $\sigma 1$ -AV/ $\mu 1$ -AV resulted in a virus that was able to infect Vero cells independently of the presence of chymotrypsin, with even a small reduction in its presence, similar to the parental VeroAV. The two proteins are thus solely responsible for the adaptation of VeroAV to better infect Vero cells.

The $\sigma 1$ -AV protein VeroAV combined with $\mu 1$ -K did confer by itself an ability to promote infection of Vero cells in the absence of chymotrypsin. In contrast $\mu 1$ -AV by itself had no effect when combined with $\sigma 1$ -S. Altogether, these data indicate that amino acid substitutions in $\sigma 1$ -AV are the primary determinants of the increased ability of VeroAV to infect Vero cells as virions. However, the nature of the $\mu 1$ protein is also of importance to optimize virus infection. While the $\sigma 1$ -AV/ $\mu 1$ -S virus could not be further studied, the $\sigma 1$ -AV/ $\mu 1$ -K virus was still partly dependent on prior chymotrypsin treatment

to infect Vero cells (Fig. 5), indicating that $\mu 1$ -AV contributes to overall viral fitness but may also affect the ability of $\sigma 1$ -AV to promote infection of Vero cells.

In contrast to the predominant effect of $\sigma 1$ -AV on infection of Vero cells, the $\mu 1$ -AV protein appears to be essentially responsible for increased sensitivity to chymotrypsin resulting in smaller plaques (Table II). As previously illustrated (Jabre et al., 2013), wild-type plaques are approximately 0.7–1 mm in diameter under the conditions used while VeroAV plaques are mostly punctate and less than 0.2 mm in diameter. The four different combinations of T3D^S and T3D^K proteins did not yield plaque sizes that were significantly different from wild-type while the introduction of both $\sigma 1$ -AV and $\mu 1$ -AV yielded plaques that were similar in size to that of the original VeroAV. However, the sole addition of $\mu 1$ -AV to either $\sigma 1$ -S or $\sigma 1$ -K resulted in a small-plaque phenotype suggesting that $\mu 1$ -AV is responsible for this phenotype, as expected from its altered kinetics of chymotrypsin cleavage *in vitro* in the original VeroAV. The exact contribution of $\sigma 1$ -AV to this phenotype was more difficult to assess since it was not fully compatible with other $\mu 1$ proteins. However, despite a lower virus titer, plaques were still seen when $\sigma 1$ -AV was combined with $\mu 1$ -K; their size was intermediate between that of T3D^S and VeroAV plaques. The resistance $\sigma 1$ -AV to *in vitro* chymotrypsin digestion of the parental VeroAV (as shown in Fig. 3, lower panel) also supports the idea that it is not the principal determinant of chymotrypsin sensitivity or of altered virus disassembly.

5.2.5.6 Further characterization of rescued T3D^K($\sigma 1$ -AV/ $\mu 1$ -AV)

The phenotypic properties of the rescued virus harboring either the $\sigma 1$ and $\mu 1$ protein of either T3D^S or VeroAV in the T3D^K background were then further examined. First, the effect of neuraminidase treatment on binding to Vero cells was examined by comparing the original T3D^S and VeroAV with the rescued viruses, namely T3D^K($\sigma 1$ -AV/ $\mu 1$ -AV) and T3D^K($\sigma 1$ -S/ $\mu 1$ -S). The results confirmed that the presence of both $\sigma 1$ and $\mu 1$ of VeroAV increased sensitivity to neuraminidase treatment up to a level similar to that of the original VeroAV (Fig.6, panel A). However, the increased binding of T3D^S observed upon neuraminidase treatment was not observed with T3D^K($\sigma 1$ -S/ $\mu 1$ -S). This suggests that other differences between T3D^S and T3D^K do exist in other viral protein(s)

and that they indirectly affect the phenotype of $\sigma 1$, as shown by others with amino acids substitutions in $\lambda 2$ (Shmulevitz et al. 2012).

The kinetics of *in vitro* proteolytic uncoating of the same two rescued viruses was then examined and compared with that of the original T3D^S and VeroAV, as in Fig. 3. This time, uncoating was examined at both 37°C and 28°C, as described (Sarkar and Danthi, 2013). Removal of $\sigma 3$ was less efficient for T3D^K($\sigma 1$ -AV/ $\mu 1$ -AV) than for T3D^K($\sigma 1$ -S/ $\mu 1$ -S), as with the original viruses (Fig. 6, panel B), and this was better evidenced at the lower temperature; this indicates that the different kinetics of uncoating was maintained in the rescued viruses. More importantly, T3D^K($\sigma 1$ -S/ $\mu 1$ -S) showed an almost complete conversion of $\mu 1C$ to δ at 37°C, as expected, while in T3D^K($\sigma 1$ -AV/ $\mu 1$ -AV) there was a decline of $\mu 1C$ without concomitant accumulation of δ . Again, the phenotype of T3D^K($\sigma 1$ -AV/ $\mu 1$ -AV) was thus essentially the same as that of the original VeroAV, in which δ is rapidly removed from ISVPs in the presence of proteases, and the wild-type T3D^K($\sigma 1$ -S/ $\mu 1$ -S) behaves as the original T3D^S virus.

Finally, immunoblotting was performed on viral particles for some of these viruses whose titers were sufficiently high (Fig. 7). It was found that both the sequence of $\sigma 1$ and $\mu 1$ affected the amount of virion-associated $\sigma 1$. Virions corresponding to plasmid-rescued VeroAV T3D^K($\sigma 1$ -AV/ $\mu 1$ -AV) harbor more $\sigma 1$ relative to $\sigma 3$ than virions from plasmid-rescued T3D^K($\sigma 1$ -S/ $\mu 1$ -S), as observed with the original viruses presented on the right panel, as a control. This also corresponds to the previous observation at time 0 in Fig. 3. However, $\mu 1$ -K was able to increase the amount of both $\sigma 1$ -S and $\sigma 1$ -AV in the virion despite the fact that T3D^K itself harbors a low amount of $\sigma 1$. This again indicates that a compatibility between $\mu 1$ and $\sigma 1$ is needed to optimize both the incorporation and function of $\sigma 1$ in the viral particles. However, there was no apparent relation between the number of $\sigma 1$ molecules incorporated to the virion and either the ability to infect Vero cells (Fig. 5) or the replicative ability of these viruses on HeLa cells used for viral propagation (Fig. 4).

5.2.6 Discussion (Section 4)

As with most viruses, the replicative ability of mammalian reoviruses has been mostly examined in few cell types. In the last few years, renewed interest in oncolytic reovirus replication has led to the realization that the nature of the host cells could restrict viral infection and lead, in return, to virus adaptation. In a previous work (Jabre et al., 2013), Vero cells were chosen as a model; these cells are also classically used to grow viruses for clinical applications (Berry et al., 1999; World Health Organization, 1987) and are deficient in interferon production (Desmyter et al., 1968; Emeny and Morgan, 1979), thus facilitating large-scale production of interferon-sensitive viruses.

Surprisingly, virus persistence of reovirus in Vero cells did not give rise to a virus with an increased ability to be uncoated by lower amount of lysosomal cathepsins following viral endocytosis (Jabre et al., 2013). Accordingly, the $\sigma 3$ protein, known as the major determinant of reovirus uncoating efficiency was left unaltered in VeroAV. However, the other two outer capsid proteins, $\sigma 1$ and $\mu 1$, respectively responsible for earlier step of virus binding at the host cell surface and later step of viral disassembly, were both exhibiting amino acids substitutions. Although the position of the substitutions lead to speculate about a possible alteration of virus binding and/or later disassembly steps (Jabre et al. 2013), there was no experimental evidence to support this idea. In the present study, the virus was further studied by the new tools of plasmid-based reverse genetics in order to introduce the VeroAV amino acids substitutions in a wild-type virus background. These studies allowed to firmly establish that the $\sigma 1$ and $\mu 1$ amino acids substitutions are solely responsible for the ability of VeroAV to infect Vero cells in the absence of prior uncoating while giving rise to viruses that are more readily inactivated upon prolonged protease treatment. The increased ability to infect Vero cells was assigned essentially to an increased binding to sialic acids, as previously hypothesized (Jabre et al. 2013); however, a very interesting point is the apparent co-evolution between $\sigma 1$ and $\mu 1$, suggesting that these two proteins need to be well-adapted to each other in order to optimize viral fitness.

If binding at the cell surface is critical to the efficient infection of Vero cells by VeroAV, it may appear surprising that the wild-type viruses can attach at similar levels on L929 and Vero cells; however, this is consistent with previous observations showing that binding of wild-type ISVPs is not increased compared to virions on Vero cells, despite the increase in infection (Golden et al., 2002). It is possible that the increased binding of VeroAV virions rather contributes to facilitate later entry steps, normally bypassed in ISVPs. Asparagine 198 was previously shown to be involved in $\sigma 1$ binding to sugars containing sialic acid (Chappell et al., 1997; Dermody et al., 1990; Reiter et al., 2011), although crystallographic analysis failed to reveal a direct interaction between this amino acid residue and the sugar moieties (Reiter et al., 2011). In these studies, replacing the uncharged asparagine by an acidic amino acid (aspartic acid) was shown to preclude sialic acid binding. Reciprocally, in VeroAV, replacing asparagine by a basic amino acid (lysine) increases sialic acid binding. The observation that N198K was already found early in the process of viral adaptation (Jabre et al., 2013) pleads in favor of its prominent role in the phenotype on Vero cells. However, the virus harboring solely this substitution was only partially able to bypass the restriction in Vero cells and still exhibited reduced infectivity (data not shown), indicating that later amino acids substitutions were required to achieve optimal infection as in VeroAV. Furthermore, it cannot be excluded that some other changes were later selected due to gradual virus-cell coevolution, as observed during reovirus persistence of various cell types (reviewed by: Dermody, 1998).

Unexpectedly, an approximately threefold increase in the amount of $\sigma 1$ in VeroAV virions compared to the wild-type was observed in the course of this work, and was shown to depend on both the nature of the $\sigma 1$ and $\mu 1$ proteins. However, the increased amount of $\sigma 1$ *per se* does not increase infectivity on Vero cells in the absence of adequate amino acid substitutions. It has been reported that some reovirus strains such as type 3 Dearing harbors an average of approximately 18 trimers of $\sigma 1$ per particle while type 1 Lang harbors a full complement of 36 trimers (Coombs, 1998; Larson et al., 1994); considering the relative difficulty of precisely comparing these results, they appear consistent with a threefold increase in the amount of $\sigma 1$ that was observed in VeroAV, rendering it similar to T1L with probably the highest possible number of $\sigma 1$ trimers. It is interesting to note that reducing trimers to only three copies does not seem to affect

infectivity, at least in L929 cells (Larson et al., 1994); the lack of effect on viral infectivity on Vero cells when the number of wild-type $\sigma 1$ trimers increased is also consistent with this idea. Interestingly, an approximately 3-fold difference in $\sigma 1$ incorporation between two viral clones of reovirus type 3 Dearing was also recently reported (Nygaard et al., 2013) and attributed to an amino acid substitution in the virion-anchoring region of $\sigma 1$. In VeroAV, the substitution at position 78 is outside the critical 28 amino acid amino-terminal anchoring region; although it cannot be excluded that this substitution in the adjacent region may influence incorporation (Leone et al., 1991). The exact significance of these variations in the amount of virion-incorporated $\sigma 1$, if any, remains to be established but is likely due to differences in the structural stability of the capsid (Coombs, 1998). This is also supported by the observation that the loss of $\sigma 1$ upon long-term storage of the virion at 4°C is more drastic in strains that already have a lower amount of $\sigma 1$ per virion (Nygaard et al., 2013).

Although the amino acid substitutions in $\mu 1$ do not appear to be directly involved in the ability of VeroAV to infect Vero cells, the nature of the $\mu 1$ protein does affect viral replication *per se* and ability to infect Vero cells in the presence of the $\sigma 1$ protein of VeroAV. The apparent co-evolution of $\sigma 1$ and $\mu 1$ suggests that these two proteins need to be well-adapted to each other in order to optimize viral fitness. Similar observations were previously made in different contexts such as the determinants of apoptosis or neurovirulence (Clarke et al., 2001; Derrien et al., 2003; Hrady et al., 1982; Rodgers et al., 1997; Tyler et al., 1996). These $\mu 1$ changes selected in VeroAV were probably necessary due to the nature of the $\mu 1$ protein in the initial wild-type virus (T3D^S) since other $\mu 1$ sequences such as that of T3D^K are also able, although not as efficiently, to accommodate the $\sigma 1$ protein of VeroAV. As previously discussed (Jabre et al., 2013), the contact regions between $\mu 1$ in neighboring heterohexamers are similar to the contact regions between $\mu 1$ and the $\lambda 2$ turret protein suggesting that amino acids at this interface, such as amino acid 89, could affect association or exposure of $\sigma 1$ at the virion's surface (Liemann et al., 2002; Zhang et al., 2005; Middleton et al., 2007). The data presented herein give further support to the idea that these two proteins functionally interact.

The presence of a valine at position 305 of $\mu 1$ in both T3D^S and VeroAV also deserves to be further stressed; as previously noted, most isolates of mammalian

reoviruses harbor a valine while an alanine is found in some virus stocks such as T3D^K. This amino acid was recently shown to affect autocleavage and viral disassembly (Madren et al., 2012; Sarkar and Danthi, 2010) and this difference could explain why the reverse genetics viruses harboring the μ 1-K protein are able to promote infection in the absence of chymotrypsin when combined with the σ 1-AV protein while the original μ 1-S is not. Thus, there is clearly an influence of the original sequence of the virus on the final result obtained upon viral adaptation to a given cell line. Although it is difficult to predict how a virus having a different μ 1, such as T3D^K, would have evolved under the same conditions, it is likely that either σ 1 alone or σ 1 and μ 1 would have adapted to Vero cells since T3D^K virions infect these cells poorly.

In the present and previous manuscript (Jabre et al., 2013), Vero cells were used to demonstrate that it is possible to generate novel reoviruses that are adapted to different cell lines and that this does not solely rely on the ability of the virus to be uncoated, as in the classical L929 cells model. These proof of concept experiments suggest that it should be also possible to adapt the virus to different cell types in order to further optimize reovirus oncolytic ability. This idea has been previously suggested and, accordingly, novel viruses were found to be better adapted as oncolytic agents (Kim et al., 2011; Rudd and Lemay, 2005; Shmulevitz et al., 2012; van den Wollenberg et al., 2012). Viruses selected for their large-plaque phenotype using L929 cells, somewhat reminiscent of larger plaques formed by VeroAV on Vero cells in the absence of chymotrypsin, were shown to be better oncolytic viruses both *in vitro* and in animal models (Shmulevitz et al., 2012). A recent report (van den Wollenberg et al., 2012) also suggests that the ability to infect cells independently of the JAM receptor, possibly due to increased binding to sialic acids, could be a useful strategy against cancer cell types that express low levels of JAM and are thus relatively resistant to reovirus (van den Hengel et al., 2013; van den Wollenberg et al., 2009; van Houdt et al., 2008). Furthermore, a virus harboring a deletion of the JAM binding domain and binding solely onto cell surface sialic acids, was shown to be attenuated in nontransformed cells while retaining an oncolytic potential and exhibiting reduced host toxicity (Kim et al., 2011). Although there is no evidence yet that VeroAV has a superior oncolytic activity, it will thus be of interest to further study its ability to lyse tumor cells in tissue culture and eventually in animal models. Novel variant viruses,

such as VeroAV, combined with the use of reverse genetics could allow the design of superior oncolytic agents while getting fundamental knowledge on the viral and cellular factors that determine a successful reovirus infection.

5.2.7 Acknowledgments

We thank Dr. Takeshi Kobayashi and Dr. Terence Dermody (Vanderbilt University, Nashville, Tennessee) for their generous gift of the plasmids used for reverse genetics. We thank Simon Léveillé and Dr John Hiscott (Lady Davis Research Institute, Montreal, Canada) for the initial stock of BHK cells expressing the T7 RNA polymerase, Dr Kevin Coombs (University of Manitoba) for the hybridoma cells producing antireovirus monoclonal antibodies and Dr Earl G. Brown (Ottawa University) for the anti- $\sigma 1$ polyclonal antiserum originally obtained from Dr Terence Dermody (Vanderbilt University). We thank Miguel Chagnon (Département de Mathématiques et Statistiques, Université de Montréal) for his help with statistical analysis and interpretation.

This work was supported by an operating grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to G.L. We thank the “Faculté des études supérieures et postdoctorales” of the “Université de Montréal” for partial financial support to V.S.

We thank Roland Jabre for numerous helpful discussions and Dr. George Szatmari (Université de Montréal) for critical reading and very helpful suggestions to improve the manuscript.

5.2.8 References

- Baer, G.S., 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.
- Berger, A.K., Danthi, P., 2013. Reovirus activates a caspase-independent cell death pathway. *MBio* 4, e00178.
- Berry, J.M., Barnabé, N., Coombs, K.M., Butler, M., 1999. Production of reovirus type-1 and type-3 from Vero cells grown on solid and macroporous microcarriers. *Biotechnol. Bioeng* 62, 12–19.
- 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.
- Boehme, K.W., Ikizler, M., Kobayashi, T., Dermody, T.S., 2011. Reverse genetics for mammalian reovirus. *Methods* 55, 109–113.
- Bokiej, M., Dermody, T.S., 2012. Optimum length and flexibility of reovirus attachment protein sigma1 are required for efficient viral infection. *J. Virol.* 19, 10270–10280.
- 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.
- Chappell, J.D., Gunn, V.L., Wetzel, J.D., Baer, G.S., 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 $\sigma 1$. *J. Virol.* 71, 1834–1841.
- Chappell, J.D., Barton, E.S., Smith, T.H., Baer, G.S., Duong, D.T., Nibert, M.L., Dermody, T.S., 1998. Cleavage susceptibility of reovirus attachment protein $\sigma 1$ during proteolytic disassembly of virions is determined by a sequence polymorphism in the $\sigma 1$ neck. *J. Virol.* 72, 8205–8213.
- Clarke, P., Meintzer, S.M., Widmann, C., Johnson, G.L., Tyler, T.S., 2001. Reovirus infection activates JNK and the JNK-dependent transcription factor c-Jun. *J. Virol.* 75, 11275–11283.
- Clarke, P., Richardson-Burns, S.M., DeBiasi, R.L., Tyler, K.L., 2005. Mechanisms of apoptosis during reovirus infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 289, 1–24.
- 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.
- Coombs, K.M., 1998. Stoichiometry of reovirus structural proteins in virus, ISVP, and core particles. *Virology* 243, 218–228.
- 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.
- Danthi, P., Guglielmi, K.M., Kirchner, E., Mainou, B., Stehle, T., Dermody, T.S., 2010. From touchdown to transcription: the reovirus cell entry pathway. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 343, 91–119.

- Dermody, T.S., Nibert, M.L., Bassel-Duby, R., Fields, B.N., 1990. A $\sigma 1$ region important for hemagglutination by serotype 3 reovirus strains. *J. Virol.* 64, 5173–5176.
- Dermody, T.S., 1998. Molecular mechanisms of persistent infection by reovirus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 233, 1–22.
- Dermody, T.S., Parker, J.S.L., Sherry, B., 2013. Orthoreoviruses, in: Knipe, D.M., Howley, P.M., (Eds.), *Fields Virology*, 6th ed. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, pp. 1305–1391.
- Derrien, M., Hooper, J.W., Fields, B.N., 2003. The M2 gene segment is involved in the capacity of reovirus type 3 Abney to induce the oily fur syndrome in neonatal mice, a S1 gene segment-associated phenotype. *Virology* 305, 25–30.
- 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.
- Doyle, J.D., Danthi, P., Kendall, E.A., Ooms, L.S., Wetzel, J.D., Dermody, T.S., 2012. Molecular determinants of proteolytic disassembly of the reovirus outer capsid. *J. Biol. Chem.* 287, 8029–8038.
- Ebert, D.H., Wetzel, J.D., Brumbaugh, D.E., Chance, S.R., Stobie, L.E., Baer, G.S., Dermody, T.S., 2001. Adaptation of reovirus to growth in the presence of protease inhibitor E64 segregates with a mutation in the carboxy terminus of viral outer-capsid protein sigma3. *J. Virol.* 75, 3197–3206.
- 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.
- Frierson, J.M., Pruijssers, A.J., Konopka, J.L., Reiter, D.M., Abel, T.W., Stehle, T.,

- Dermody, T.S., 2012. Utilization of sialylated glycans as coreceptors enhances the neurovirulence of serotype 3 reovirus. *J. Virol.* 86, 13164–13173.
- Golden, J.W., Linke, J., Schmechel, S., Thoemke, K., Schiff, L.A., 2002. Addition of exogenous protease facilitates reovirus infection in many restrictive cells. *J. Virol.* 76, 7430–7443.
- Hand, R., Tamm, I., 1973. Reovirus: effect of noninfective viral components on cellular deoxyribonucleic acid synthesis. *J. Virol.* 11, 223–231.
- 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.
- Haselhorst, T., Fleming, F.E., Dyason, J.C., Hartnell, R.D., Yu, X., Holloway, G., Santegoets, K., Kiefel, M.J., Blanchard, H., Coulson, B.S., von Itzstein, M., 2009. Sialic acid dependence in rotavirus host cell invasion. *Nat. Chem. Biol.* 5, 91–93.
- Hrdy, D.B., Rubin, D.H., Fields, B.N., 1982. Molecular basis of reovirus neurovirulence: role of the M2 gene in avirulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 1298–1302.
- 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.
- 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.
- Kim, M., Garant, K.A., zur Nieden, N.I., Alain, T., Loken, S.D., Urbanski, S.J., Forsyth, P.A., Rancourt, D.E., Lee, P.W., Johnston, R.N., 2011. Attenuated reovirus displays oncolysis with reduced host toxicity. *Br. J. Cancer* 104, 290–299.

- 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.
- 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.
- Larson, S.M., Antczak, J.B., Joklik, W.K., 1994. Reovirus exists in the form of 13 particle species that differ in their content of protein sigma1. *Virology* 201, 303–311.
- Lemay, G., 2011. La génétique inverse dans l'étude des réovirus : progrès, obstacles et développements futurs (Reverse genetics in the study of reoviruses: progress, obstacles and future developments). *Virologie* 15, 53-62 (in French).
- Leone, G., Mah, D.C., Lee, P.W., 1991. The incorporation of reovirus cell attachment protein sigma 1 into virions requires the N-terminal hydrophobic tail and the adjacent heptad repeat region. *Virology* 182, 346–350.
- Liemann, S., Chandran, K., Baker, T.S., Nibert, M.L., Harrison, S.C., 2002. Structure of the reovirus membrane-penetration protein, Mu1, in a complex with its protector protein, Sigma3. *Cell* 108, 283–295.
- Madren, J.A., Sarkar, P., Danthi, P., 2012. Cell entry-associated conformational changes in reovirus particles are controlled by host protease activity. *J. Virol.* 86, 3466–3473.
- Maitra, R., Ghalib, M.H., Goel, S., 2012. Reovirus: a targeted therapeutic—progress and potential. *Mol. Cancer Res* 10, 1514–1525.

- 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.
- Middleton, J.K., Agosto, M.A., Severson, T.F., Yin, J., Nibert, M.L., 2007. Thermostabilizing mutations in reovirus outer-capsid protein mu1 selected by heat inactivation of infectious subviriion particles. *Virology* 361, 412–425.
- Nibert, M.L., Chappell, J.D., Dermody, T.S., 1995. Infectious subviriion particles of reovirus type 3 Dearing exhibit a loss in infectivity and contain a cleaved sigma 1 protein. *J. Virol.* 69, 5057–5067.
- 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.
- Reiter, D.M., Frierson, J.M., Halvorson, E.E., Kobayashi, T., Dermody, T.S., Stehle, T., 2011. Crystal structure of reovirus attachment protein $\sigma 1$ in complex with sialylated oligosaccharides. *PLoS Pathog.* 7, e1002166.
- Rodgers, S.E., Barton, E.S., Oberhaus, S.M., Pike, B., Gibson, C.A., Tyler, K.L., Dermody, T.S., 1997. Reovirus-induced apoptosis of MDCK cells is not linked to viral yield and is blocked by Bcl-2. *J. Virol.* 71, 2540–2546.
- 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.
- Sarkar, P., Danthi, P., 2010. Determinants of strain-specific differences in efficiency of reovirus entry. *J. Virol.* 84, 12723–12732.

- Sarkar, P., Danthi, P., 2013. The mu1 72–96 loop controls conformational transitions during reovirus cell entry. *J. Virol.* 87, 13532–13542.
- Shmulevitz, M., Gujar, S.A., Ahn, D.G., Mohamed, A., Lee, P.W.K., 2012. Reovirus variants with mutations in S1 and L2 genome segments exhibit enhanced virion infectivity and superior oncolysis. *J. Virol.* 86, 7403–7413.
- Thirukkumaran, C.M., Shi, Z.Q., Luider, J., Kopciuk, K., Gao, H., Bahlis, N., Neri, P., Pho, M., Stewart, D., Mansoor, A., Morris, D.G., 2013. Reovirus modulates autophagy during oncolysis of multiple myeloma. *Autophagy* 9, 413–414.
- Tyler, K.L., Squier, M.K.T., Brown, A.L., Pike, B., Willis, D., Oberhaus, S.M., Dermody, T.S., Cohen, J., 1996. Linkage between reovirus-induced apoptosis and inhibition of cellular DNA synthesis: role of the S1 and M2 genes. *J. Virol.* 70, 7984–7991.
- 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., Van Den Hengel, S.K., Dautzenberg, I.J., Kranenburg, O., Hoeben, R.C., 2009. Modification of mammalian reoviruses for use as oncolytic agents. *Expert Opin. Biol. Ther.* 9, 1509–1520.
- 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.
- van Houdt, W.J., Smakman, N., van den Wollenberg, D.J.M., Emmink, B.L., Veenendaal,

- L.M., van Diest ,P.J., Hoeben, R.C., Borel Rinkes, I.H.M., Kranenburg, O., 2008. Transient infection of freshly isolated human colorectal tumor cells by reovirus T3D intermediate subviral particles. *Cancer Gene Ther.* 15, 284–292.
- 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.
- Wetzel, J.D., Wilson, G.J., Baer, G.S., Dunnigan, L.R., Wright, J.P., Tang, D.S., 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.
- Wilson, G.J., Nason, E.L., Hardy, C.S., Ebert, D.H., Wetzel, J.D., Venkataram Prasad, B.V., Dermody, T.S., 2002. A single mutation in the carboxy terminus of reovirus outer-capsid protein sigma 3 confers enhanced kinetics of sigma 3 proteolysis, resistance to inhibitors of viral disassembly, and alterations in sigma 3 structure. *J. Virol.* 76, 9832–9843.
- World Health Organization., 1987. Requirements for continuous cell lines used for biological substances. In: *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.* 745, 1987, 99–115.
- Zhang, X., Ji, Y., Zhang, L., Harrison, S.C., Marinescu, D.C., Nibert, M.L., Baker, T.S., 2005. Features of reovirus outer capsid protein mu1 revealed by electron cryomicroscopy and image reconstruction of the virion at 7.0 Angstrom resolution. *Structure* 13, 1545–1557.

5.2.9 Tables and figures

Tableau IV : (Table 1). Amino acids substitutions in outer capsid proteins of VeroAV.

	T3D ^S	T3D ^K	VeroAV	Amino acid position
$\sigma 1$	Q	Q	P	78
	N	N	K	198
	I	T	I	249
	S	Y	S	253
	A	T	A	408
$\mu 1$	E	E	G	89
	A	A	V	114
	V	A	V	305
	T	A	T	449

Differences between the original reverse genetics wild-type clone T3D^K and both the laboratory wild-type virus stock T3D^S and VeroAV are indicated by light gray boxes. Substitutions unique to VeroAV are indicated by dark gray boxes.

Tableau V : (Table 2). Plaque size of rescued viruses.

	σ1-S	σ1-K	σ1-AV
μ1-S	Large	Large	(-)
μ1-K	Large	Large	Reduced
μ1-AV	Small	Small	Small

Plaque assays were performed on Vero cells in the presence of chymotrypsin, as described in Section 2. Examination of representative plaques 4 days post-infection was done after staining and under an inverted microscope. Large and small plaques were previously illustrated (Jabre et al., 2013); reduced plaques have an intermediate phenotype while (-) indicates the lack of visible plaques.

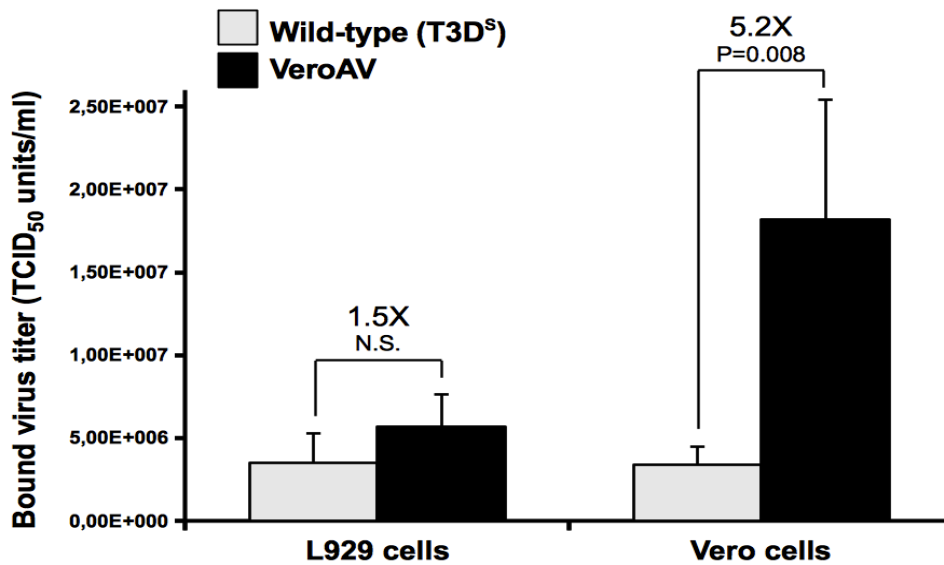


Fig. 1. Virus binding at the cell surface.

Inoculum of 8×10^8 TCID₅₀ units of the original wild-type T3D (T3D^S) or of the derived Vero cell-adapted virus (VeroAV) were adsorbed at the surface of either L929 or Vero cells at a multiplicity of infection of 80 TCID₅₀ units/cell. Following binding for 1 h at 4°C, cells were washed and bound virus was quantitated by TCID₅₀ titration on L929 cells. Results are presented as the mean of 5 (L929 cells) and 8 (Vero cells) independent binding experiments. Error bars represent standard error of the mean. *p*-value are based on a linear mixed-effects model using a random intercept grouped by replica. N.S.: not statistically significant, $p > 0.05$

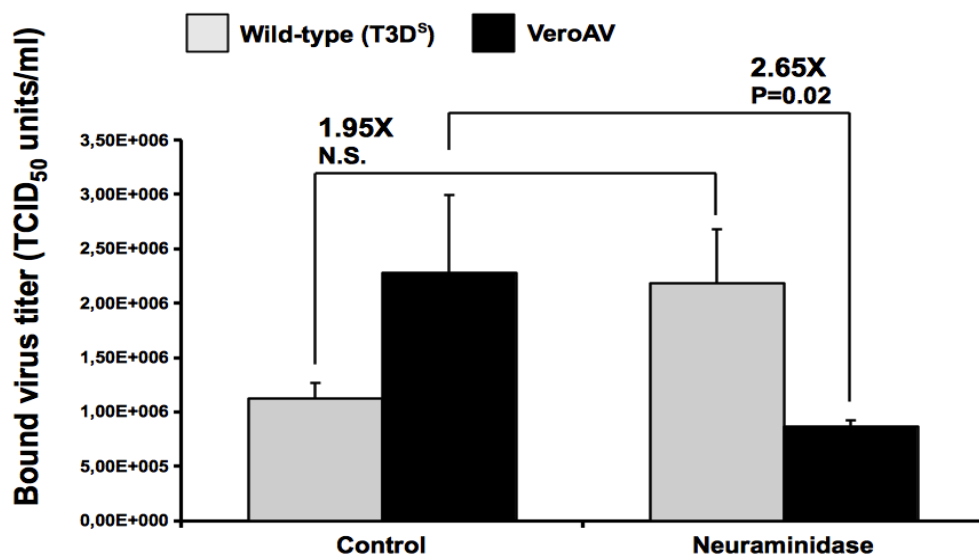


Fig. 2. Effect of sialic acid removal on virus binding.

Vero cells were left untreated or pre-treated with neuraminidase, before adsorption of 2×10^8 TCID₅₀ units of T3D^S or VeroAV virions and quantitation of bound virus, as in Fig. 1. Results are presented as the mean of four independent binding experiments with error bars representing standard error of the mean. *p*-value are based on a linear mixed-effects model using a random intercept grouped by replica. N.S.: not statistically significant, *p* > 0.05

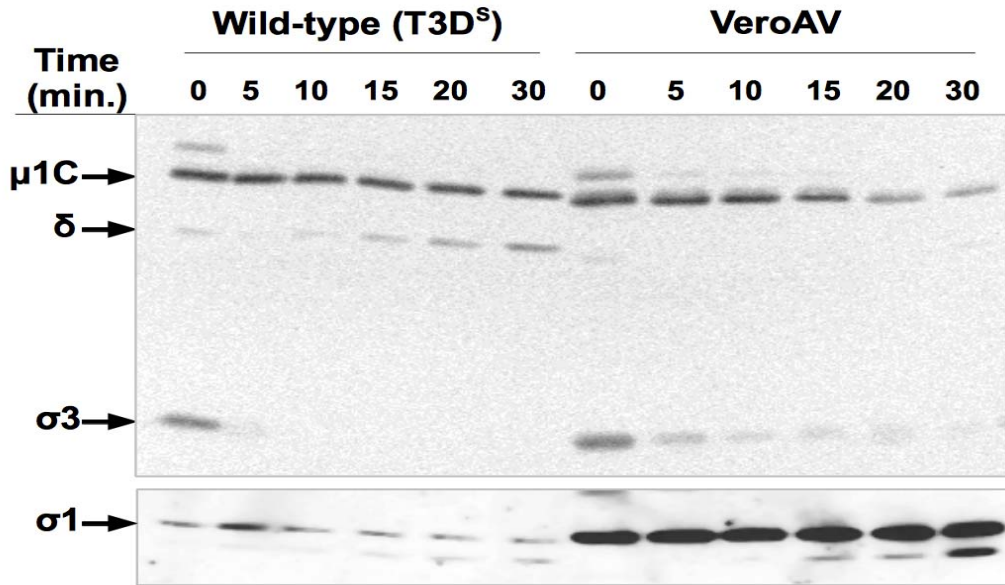


Fig. 3. *In vitro* proteolytic cleavage of outer capsid proteins.

Virions from infectious stocks of T3D^S or VeroAV were extracted with VertrelTM and treated for the indicated times at 37°C with 10 μ g/ml chymotrypsin, as described in Methods. Reactions were stopped and proteins analyzed by immunoblotting using combination of anti- $\sigma 3$ and anti- $\mu 1$ monoclonal antibodies (upper panel) or polyclonal antiserum against $\sigma 1$ (lower panel). Positions of viral capsid proteins are indicated by arrows.

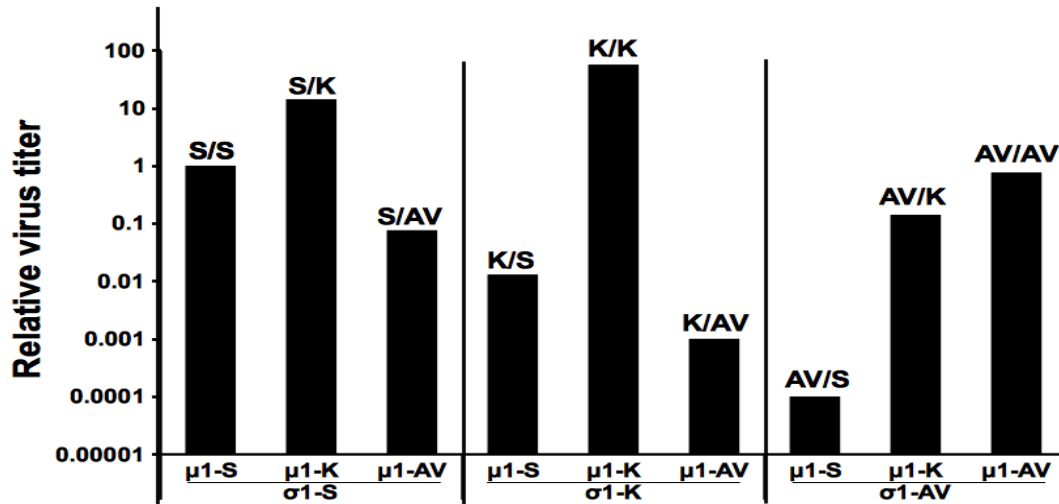


Fig. 4. Replicative ability of rescued viruses.

HeLa cells were infected at a MOI of 2 TCID₅₀ units/cell and virus stocks obtained by freeze–thaw lysate 48 h post-infection. Virus titers were obtained by TCID₅₀ on L929 cells. Results are presented relative to the titer obtained with the T3D^K(σ1-S/μ1-S) combination (7×10^7 PFU/ml) that was arbitrarily fixed to 1.

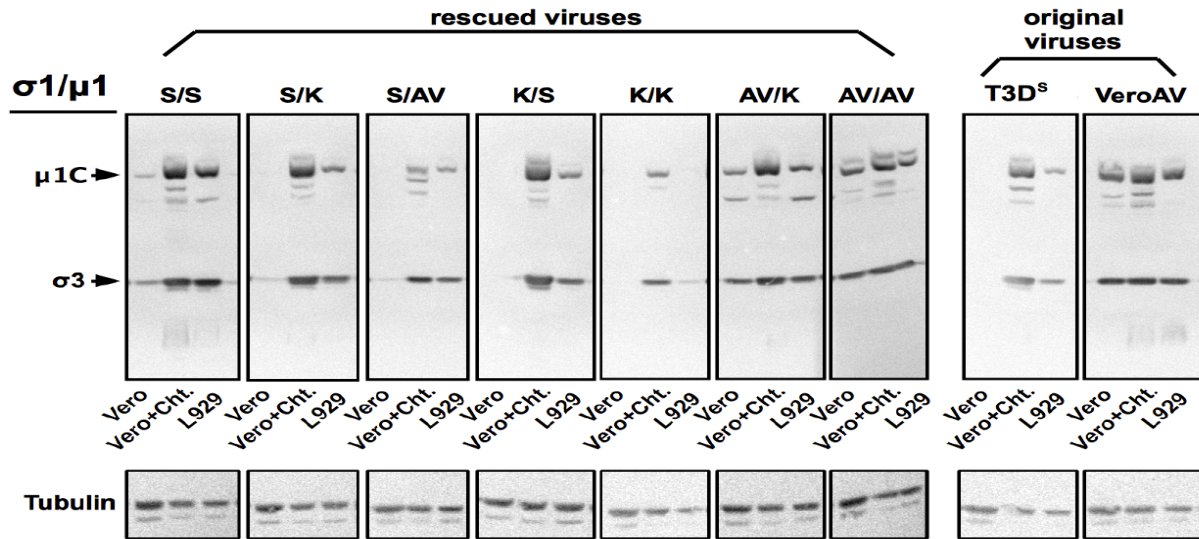


Fig. 5. Infection of Vero cells with rescued viruses.

Viruses obtained by reverse genetics were used to infect Vero cells at a MOI of 2 in the absence or presence of chymotrypsin, as indicated; L929 cells were used as control. Proteins were recovered 24 h post-infection and analyzed by immunoblotting using a combination of anti- $\sigma 3$ and anti- $\mu 1$ monoclonal antibodies; positions of $\sigma 3$ and $\mu 1C$ are indicated. Lower panels present the same membrane that was re-probed with rabbit anti-tubulin antiserum indicating similar amount of proteins in each lane. Infections with the original T3D^S and VeroAV are presented as controls.

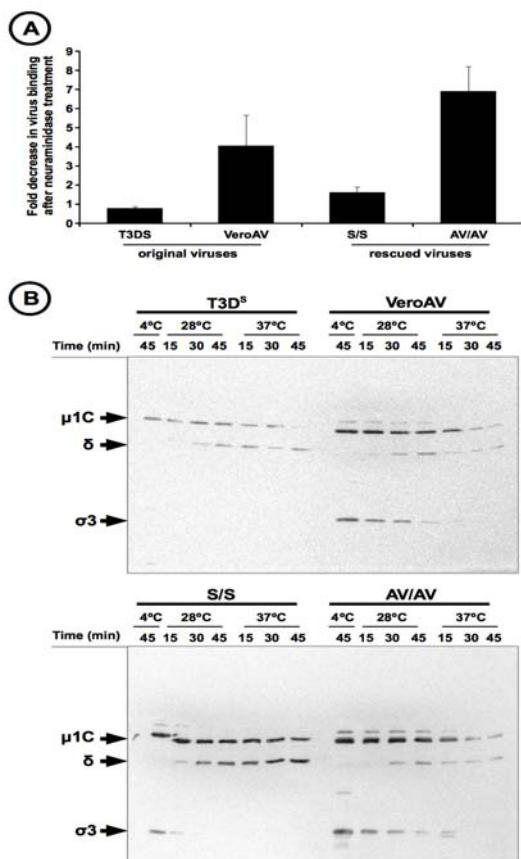


Fig. 6. Phenotypic properties of rescued T3D^K($\sigma 1$ -AV/ $\mu 1$ -AV).

Vero cells were left untreated or pre-treated with neuraminidase, as in figure 2, before adsorption of T3D^K, VeroAV, rescued T3D^K($\sigma 1$ -S/ $\mu 1$ -S) or rescued T3D^K($\sigma 1$ -AV/ $\mu 1$ -AV) at a multiplicity of infection of 80 TCID₅₀ units/cell. Following binding for 1 h at 4°C, cells were washed and bound virus was quantitated by TCID₅₀ titration on L929 cells, as in Figs. 1 and 2. The average effect of neuraminidase in two representative experiments is presented with error bars representing standard error of the mean (panel A). Virions from original T3D^S and VeroAV (upper panel) or rescued T3D^K($\sigma 1$ -S/ $\mu 1$ -S) and T3D^K($\sigma 1$ -AV/ $\mu 1$ -AV) were extracted with VertrelTM and treated for the indicated times at either 28°C or 37°C with chymotrypsin, a control reaction was left at 4°C (panel B). Reactions were stopped and proteins analyzed by immunoblotting using combination of anti- $\sigma 3$ and anti- $\mu 1$ monoclonal antibodies. Positions of $\sigma 3$ and $\mu 1C$ and δ proteins are indicated by arrowheads.

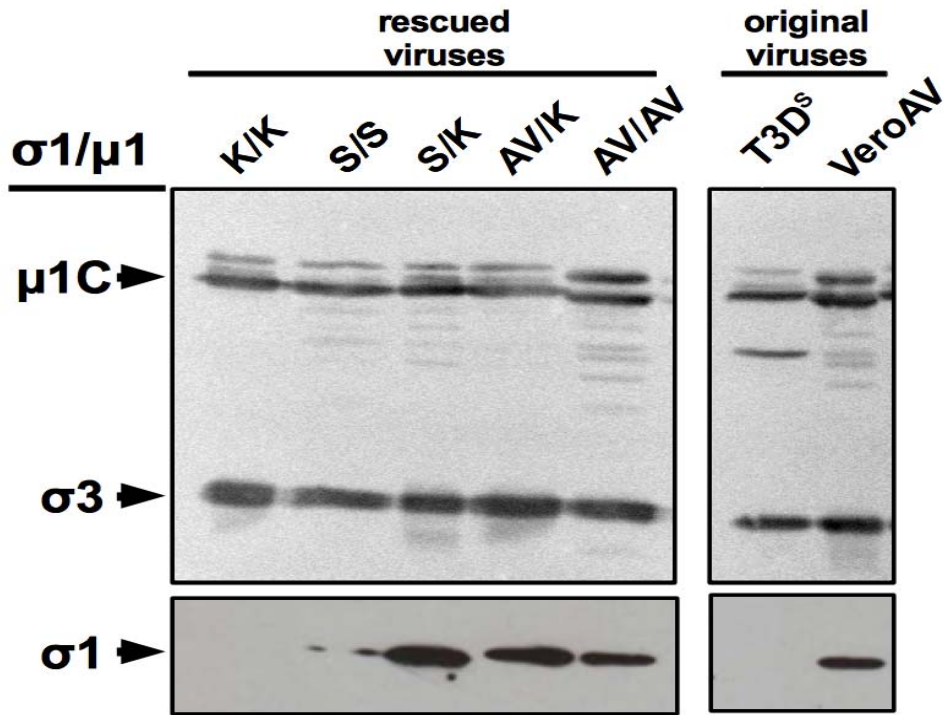


Fig. 7. Amount of $\sigma 1$ in virions of rescued viruses.

Infectious virus stocks were extracted once with VertrelTM and proteins analyzed by immunoblotting using a combination of anti- $\sigma 3$ and anti- $\mu 1$ monoclonal antibodies (upper panels) or the anti- $\sigma 1$ polyclonal antiserum (lower panels); positions of $\sigma 3$, $\mu 1C$ and $\sigma 1$ are indicated. The original T3D^S and VeroAV are presented as controls.

5.2.10 Supplementary figure

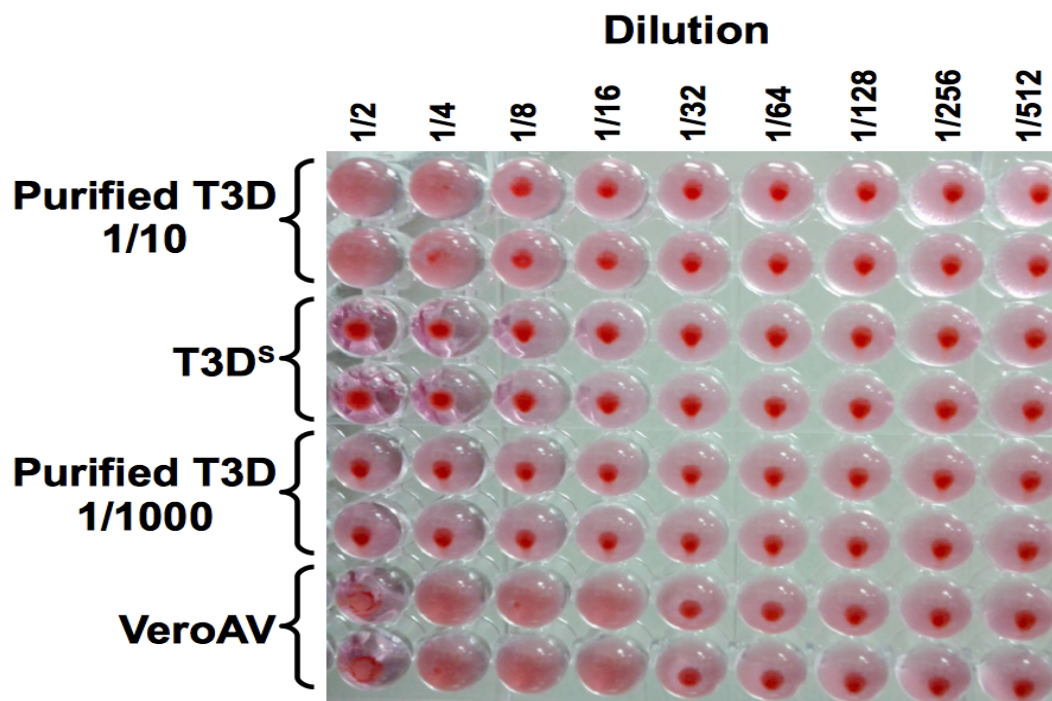


Fig. S1. Hemagglutination potential of VeroAV compared to the T3DS.

Virus stocks were extracted once with Vertrel to remove most of cellular debris and concentrated by ultrafiltration using Sartorius Vivaspin Turbo 15 centrifugal concentrators (molecular weight cutoff of 1 000 kDa). Serial binary dilution was done in tissue culture medium without serum, starting from an initial titer of 2×10^9 TCID₅₀ units/ml. As a control, cesium-chloride purified virus was first diluted 10-fold to reach an infectious titer of approximately 10¹⁰ TCID₅₀ units/ml and similarly subjected to serial binary dilution. Fifty microliters of viruses at different dilutions were placed in round-bottom 96-wells microplates. Washed 10% bovine red blood cells (Cedarlane) were diluted to 1.5% in tissue culture medium and 50 μ l were added to each well. Plates were examined and photographed after 3 hours of incubation at 4°C.

5.3 Une substitution d'un acide aminé sur l'enzyme lambda2 est responsable d'une sensibilité accrue à l'interféron.

Dans ce troisième article, nous voulions étudier plus en détail un virus précédemment isolé au laboratoire, soit le P4L-12. Ce virus démontrait une grande sensibilité à l'IFN, phénotype qui était corrélé avec un meilleur blocage dans les cellules parentales (Rudd and Lemay, 2005). Des substitutions d'acides aminés avaient préalablement été identifiées sur mu1 et sigma3. Après séquençage complet de P4L-12 ainsi que de notre virus de type sauvage de notre laboratoire (T3D^S), nous avons identifié d'autres substitutions sur lambda2 et muNS. Nous avons reconstruit par génétique inverse un T3D^S et un P4L-12 afin de valider les phénotypes de sensibilité à l'IFN. Suite à l'obtention des simples mutants par génétique inverse, nous sommes parvenus à démontrer que c'est la substitution sur lambda2 qui est principalement responsable de la sensibilité accrue à l'IFN. Ce résidu conférant cette sensibilité à l'IFN se retrouve dans un des domaines méthyltransférase de $\lambda 2$, aspect qui n'a jamais été décrit pour réovirus.

L'article a été soumis sous la rubrique *Brief communication* dans la revue *Virology* en décembre 2014 et a pour titre «**A single amino acid substitution in the mRNA capping enzyme $\lambda 2$ of a mammalian orthoreovirus mutant increases interferon sensitivity.**».

Contribution des auteurs:

J'ai construit les virus mutants et j'ai effectué toutes les expériences. J'ai contribué à la création de figures et tableaux et ainsi qu'à la révision du manuscrit.

5.3.1 Research highlights

► An interferon sensitive reovirus mutant differ from the wild-type laboratory by amino acids substitutions in four proteins. ► Wild-type laboratory stock and mutant viruses were reconstructed by reverse genetics. ► Each mutant gene was substituted by its wild-type counterpart and reciprocally. ► Interferon sensitivity was assigned to a single substitution in one of the methyltransferase domain of the mRNA capping protein $\lambda 2$.

A single amino acid substitution in the mRNA capping enzyme $\lambda 2$ of a mammalian orthoreovirus mutant increases interferon sensitivity.

Véronique Sandekian and Guy Lemay

Département de Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Running title: **Reovirus' Interferon Sensitivity**

Keywords: Reovirus, Interferon, Reverse genetics, RNA capping, RNA methyltransferase

Correspondence: *Guy Lemay, Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7. E-mail:*

5.3.2 Abstract

In the last few years, the development of a plasmid-based reverse genetics system for mammalian reovirus has allowed the production and characterization of mutant viruses. This could be especially significant in the optimization of reovirus strains for virotherapeutic applications, either as gene vectors or oncolytic viruses. The genome of a mutant virus exhibiting increased sensitivity to interferon was completely sequenced and compared with its parental virus. Viruses corresponding to either the parental or mutant viruses were then rescued by reverse genetics and shown to exhibit the expected phenotypes. Systematic rescue of different viruses harboring either of the four parental genes in a mutant virus backbone, or reciprocally, indicated that a single amino acid substitution in one of $\lambda 2$ methyltransferase domains is the major determinant of the difference in interferon sensitivity between these two viruses.

5.3.3 Introduction

Mammalian reoviruses are among a plethora of viruses that are presently under investigation for their ability to preferentially infect and destroy transformed/cancer cells. This has led to recent progress in their clinical use against various forms of human cancers (briefly reviewed among others by: Kelly et al., 2009; Black and Morris, 2012). In contrast to most other “oncolytic” viruses presently under consideration for clinical use, reoviruses are naturally oncolytic and have not been submitted to genetic manipulation for their clinical use. In fact, it was not possible until recently (Kobayashi et al., 2007) to easily manipulate the reovirus genome using a plasmid-based reverse genetics system.

The initial observations that led to the utilization of reovirus as an “oncolytic” virus suggested that a decreased activity of the interferon-inducible double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR), which occurs upon Ras-induced cell transformation, was responsible for the preferential infection and destruction of cancer cells by reovirus (Strong et al., 1998). Despite the fact that multiple steps of the reovirus replicative cycle are likely involved in preferential replication and virus-induced cancer cell death (Lemay et al., 2007; Marcato et al., 2007), further work has supported the idea that a lower induction of interferon in Ras-transformed cells favors viral propagation and could be of major importance to the virus' oncolytic activity (Shmulevitz et al., 2010).

To further support the idea that interferon-induced antiviral pathways are critical in the ability of reovirus to discriminate between parental and Ras-transformed cells, a mutant virus obtained by chemical mutagenesis was selected for its increased sensitivity to interferon and was actually shown to exhibit a more complete blockage than the wild-type virus in parental cells, even at extremely high multiplicity of infection (Rudd and Lemay, 2005).

Multiple reovirus genes are suspected to be involved in the control of the interferon innate immune response (Sherry, 2009; Sherry et al., 2009). The $\mu 2$ protein was shown to be the major determining factor in the control of interferon signaling induction by altering the subcellular localization of IRF-9 (Irvin et al., 2012; Zurney et al., 2009).

The $\sigma 3$ protein could rather affect interferon sensitivity due to its ability to sequester the dsRNA activator of the interferon-inducible protein kinase PKR; however, this property of $\sigma 3$ could be modulated by $\mu 1$ since the $\sigma 3$ - $\mu 1$ heterohexamer does not appear to bind dsRNA (Schiff, 2008). Finally, at least in some cell types, the $\sigma 2$ and $\lambda 2$ protein were previously suspected to play a role in the control of either induction of interferon signaling or virus' sensitivity to interferon (Sherry et al., 1998).

In order to clarify which genetic determinants are involved in the large difference in interferon sensitivity between the parental and previously identified P4L-12 mutant virus (Rudd and Lemay, 2005), the complete sequence of the viral genome was determined. Both viruses were then reconstructed by site-directed mutagenesis and reverse genetics, since a number of differences were observed between the isolate used to construct the reverse genetics plasmids and the parental laboratory stock initially used to isolate the mutant virus. Each four genes exhibiting differences between the parental and mutant viruses were then individually substituted either to replace the mutant gene by its parental counterpart or replacing the parental gene by its mutant counterpart in the parental background. This clearly demonstrated that the single amino acid substitution in one of the two methyltransferase domains of $\lambda 2$ is the major determinant of the difference in interferon sensitivity between these two viruses.

5.3.4 Results

5.3.4.1 Sequencing of the interferon-sensitive P4L-12 mutant

In order to determine the differences in sequence between the interferon-sensitive P4L-12 mutant (Rudd and Lemay, 2005) and the original wild-type type 3 Dearing (T3D) (T3/Human/Ohio/Dearing/55) from which it was derived, the whole coding sequence of the genome was analyzed by RT-PCR on the semi-purified viral genome from both the mutant and wild-type laboratory stocks, followed by direct sequencing of

the PCR products, as described in Materials and Methods and previously used in the laboratory (**Jabre et al., 2013**).

Despite the fact that the P4L-12 mutant was obtained following treatment with a high dose of the chemical mutagen nitrosoguanidine (**Rudd and Lemay, 2005**), only 4 genes were found to exhibit nonsynonymous mutations compared to the wild-type resulting in a total of 6 amino acids substitutions (**Table 1**). Of these, only the $\lambda 2$ T636M, $\mu 1$ P315S and $\sigma 3$ M221I are unique among currently available sequences of T3D (**Table 2** and **data not shown**) and were thus of special interest. Six additional silent nucleotide substitutions were also found between the wild-type and mutant virus (GeneBank accession numbers KP208804 to KP208813 for the wild-type and KP208814 to KP208823 for P4L-12 mutant).

5.3.4.2 Sequence comparison of different stocks of wild-type reovirus type 3 Dearing

The complete sequences obtained were also compared with that of the wild-type virus encoded by the 10 plasmids of the reverse genetics system (**Kobayashi et al., 2007**) and at least one amino acid change between the two wild-type viruses was found in seven out of eleven proteins; the only completely identical proteins were $\sigma 2$, $\sigma 3$, σNS and $\sigma 1s$. This is not the first time that such differences were observed between laboratory stocks of so-called reovirus type 3 Dearing (**Coffey et al., 2006; Nygaard et al., 2013; Yin et al., 2004**), this has even lead to the designation of subtypes such as T3D^F (from Fields' laboratory), T3D^N (from Nibert's laboratory) and T3D^C (from Cashdollar's laboratory). Thus, for sake of simplicity, the laboratory virus stock used in the present study will be referred to as T3D^S (Sandekian) while the wild-type virus rescued from the plasmids originally obtained from Kobayashi and Dermody will be referred to as T3D^K (Kobayashi). In addition to the 12 amino acid substitutions, 11 silent nucleotide substitutions between the two viruses were also found (data not shown).

Comparative sequence analysis was also performed with the sequence of another complete T3D genome (referred to as T3D^W) that was used in a recent study by another

group (**van den Wollenberg et al., 2012**) and the sequence of another laboratory stock deposited in the NCBI database by one further group (referred to as T3D^H); finally the sequence of the virus currently used in oncolytic virotherapy under the tradename “REOLYSIN®” was added to the comparison (**Chakrabarty et al., 2014**). Only complete sequences determined by direct sequencing of the viral genome were retained for this analysis since it is difficult to assume that sequences obtained earlier from cloned viral genes are necessarily representative and that they would actually generate a replication-competent virus when combined together.

The laboratory subtype, T3D^S, did not display any more differences from T3D^K when compared to other completely sequenced genomes. While some positions are clearly more variable, all stocks showed the presence of 8 to 19 differences including 2 to 8 unique substitutions compared to T3D^K. It thus seems that each stock, or subtype, has its own sequence “signature” and that T3D^S with 12 amino acid differences including only 3 unique substitutions is not more divergent from T3D^K than other virus stocks currently in use in different laboratories.

5.3.4.3 Reverse genetics rescue of viruses harboring single-gene substitution

In order to determine which of the amino acids differences between T3D^S and P4L-12 viruses are responsible for the difference in interferon sensitivity between the two viruses, site-directed mutagenesis was used to introduce the changes in the reverse genetics plasmids encoding the different proteins; when more than one change was found on the same protein, the corresponding nucleotide changes were all introduced on the same plasmid. Since the parental T3D (T3D^S) used to isolate P4L-12 differs from the plasmid-encoded T3D^K sequence, a complete set of plasmids encoding “wild-type” T3D^S was first constructed and then further subjected to site-directed mutagenesis to obtain P4L-12 encoding sequences.

Both a parental T3D^S and P4L-12 virus were rescued by transfection of the corresponding plasmid combination. Viruses were similarly obtained using one P4L-12 gene (L2, M2, M3 and S4) in a background of nine T3D^S genes. All these viruses were

rescued and propagated, as described in Materials and methods. Reciprocally, viruses harboring one T3D^S gene in a background of nine P4L-12 genes were also rescued and propagated.

The infectivity and replicative ability of these different viruses was then examined. L929 cells were infected at a multiplicity of infection of 2 TCID₅₀ units per cell and viral proteins in infected cells were first examined by immunoblotting (**Fig.1A**); this was a first indication that all viruses were able to infect with a similar efficiency since there were no apparent differences in the amount of viral proteins produced. Production of infectious virus was next examined by infecting cells and measuring the fold-increase of infectious virus (**Fig. 1B**). In either the T3D^S or P4L-12 background, all viruses harboring substitution of single genes from the other virus did not appear to be significantly different from their background virus. In the T3D^S background a small increase (up to approximately sixfold for the S4 substitution) was observed while in the P4L-12 background a twofold increase for observed for M2 and twofold decrease for S4. Overall, there was thus no apparent significant defects when single genes were substituted in either background.

5.3.4.4 Interferon sensitivity of rescued viruses

Having established that the different rescued viruses can replicate to similar levels in the absence of interferon, their interferon sensitivity was then examined in comparison with their respective parental viruses.

Interferon sensitivity was first examined by measuring the titer reduction on L929 cells treated at a fixed, near saturating, β -interferon concentration (200 international units/ml), as described in Materials and methods. As expected, rescued T3D^S harboring none of the P4L-12 genes exhibited resistance to interferon, its titer being almost unaffected at 200 international units/ml of interferon while rescued P4L-12 showed close to a hundred-fold decrease of its titer (**Fig. 2**). These values are comparable with those routinely obtained with the two parental viruses in previous experiments (data not shown).

Substitution of T3D^S genes encoding either μ NS or μ 1 of P4L-12 only slightly increased sensitivity to interferon by less than tenfold while σ 3 had no effect (**Fig. 2**). However, substitution of the L2 gene encoding λ 2 significantly increased the interferon sensitivity rendering the virus as sensitive as the P4L-12 virus. The reciprocal experiment where single genes from T3D^S were singly substituted in the P4L-12 background confirmed that λ 2 by itself is sufficient to render the virus as resistant as T3D^S while other proteins had only a slight (μ NS) or essentially no effect (μ 1 and σ 3) on interferon sensitivity (**Fig. 2**).

It appears very unlikely that differences in residual interferon in the viral inocula could affect the results, given the freeze-thaw treatment, dilutions used, and the fact that there was no differences in interferon induction between T3D^S and P4L-12. However, in order to further ruled out this possibility, infectious T3D^S, P4L-12 and single L2 reassortant viruses were recovered from human HeLa cells before being titrated on murine L929 cells in the presence or absence of murine interferon; in these conditions any interferon from virus inoculum will be of human origins and will not act on murine cells used in the interferon assay. Identical results were obtained, correlating the presence of L2 from P4L-12 with interferon sensitivity (data not shown).

The interferon sensitivity of the same viruses was then further examined using serial binary dilutions of interferon in 96-multiwell plates that were then stained and quantitated (**Fig. 3A**). When the rescued T3D^S virus and viruses harboring a single P4L-12 gene in this background was examined (left panel), the effect of λ 2 was again evident, especially at intermediate concentrations of interferon (approximately 10 to 50 IU/ml) while μ NS and σ 3 had no effect. In this assay, at lower interferon concentrations compared to figure 2, the μ 1 protein of P4L-12 also increased interferon sensitivity.

When viruses harboring single T3D^S genes in a P4L-12 background were similarly analyzed (**Fig.3A**, right panel), only λ 2 clearly affected interferon sensitivity, rendering the virus as resistant to interferon as T3D^S. The increased interferon sensitivity conferred by M2 of P4L-12 in the T3D^S background was not reciprocal; therefore it was not further examined in the present study.

Altogether, the effect of $\lambda 2$ was thus most striking and this gene appears to be the main and most likely the only determinant of the difference in interferon sensitivity between T3D^S and P4L-12, its presence being clearly sufficient to reconstitute the respective phenotype of the two viruses. A representative multiwell plate is presented (**Fig.3B**) comparing the original T3D^S and P4L-12 virus with their corresponding rescued virus and those where the L2 gene was singly substituted.

5.3.4.5 Expression of the $\lambda 2$ protein in infected cells

In order to rule out the possibility that there is a difference in the amount of $\lambda 2$ present in the infected cells during infection by T3D^S or P4L-12, immunoblotting was performed on the rescued viruses harboring all the genes of either viruses, as well as on the viruses harboring solely the $\lambda 2$ protein of the other virus (T3D^S background with $\lambda 2$ of P4L-12 and reciprocally). The amount of $\lambda 2$ protein in each case was compared with that of the major outer capsid protein $\mu 1$. There was no apparent difference between these four viruses (**Fig.3C**) and a simple change in $\lambda 2$ expression or stability is thus unlikely.

5.3.5 Discussion

The present study illustrates that the state-of-the-art plasmid-based reverse genetics approach can be successfully used to study and completely reconstruct virus mutants previously identified by the use of more classical genetic techniques such as chemical mutagenesis. This has allowed to identify polymorphic amino acids residues in the mammalian orthoreovirus genome as well as clearly pinpoint an amino acid substitution that can drastically affect the interferon sensitivity of viral strains. As previously mentioned, the $\lambda 2$ protein was previously identified by classical reassortment studies as a possible molecular determinant of the control of interferon response in reovirus-infected cells; however, this is the first time that this has been firmly established

using a completely defined genetic system. Interestingly, an immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) that could affect interferon signaling pathways in some cell types, is observed in $\lambda 2$, although there is currently no evidence that it is actually functional (Stebbing et al., 2014). The amino acid substitution in P4L-12 is not part of this ITAM motif.

The threonine at position 636, substituted for a methionine in P4L-12, is a conserved residue in the $\lambda 2$ protein sequence of different virus strain (Table 2) (Breun et al., 2001) and is located in one of the two methyltransferase domains (Reinisch et al., 2000; Breun et al., 2001; Bujnicki and Rychlewski, 2001). It is still not firmly established if this first methyltransferase domain is responsible for N-7 or the subsequent 2'-O methylation of the cap structure. However, sequence comparisons suggest the latter possibility (Bujnicki and Rychlewski, 2001) and is also consistent with the relative order of the two methyltransferase domains in *Cypovirus* (Zhu et al., 2014), another double-stranded RNA virus of the *Reoviridae* family. Methylation of the RNA cap structure, especially at the 2'-O position could be of importance to avoid recognition of viral RNA as nonself. It could thus affect either induction of interferon signaling or sensitivity to interferon-induced antiviral proteins, such as IFIT1 (recently reviewed by: Hyde and Diamond, 2015). This aspect has been especially well studied in members of the *Flaviviridae* family but has also been noticed in such different viruses as coronaviruses, vesicular stomatitis virus and metapneumovirus (Daffis et al., 2011; Züst et al., 2011; Habjan et al., 2013; Kimura et al., 2013; Dong et al., 2014; Kindler and Thiel, 2014; Ma et al., 2014; Menachery et al., 2014). An altered 2'-O methyltransferase activity of $\lambda 2$ could thus potentially explain the altered interferon resistance of P4L-12 compared to the parental virus. Interestingly, in rotavirus, another member of the *Reoviridae* family, the capping enzyme VP3 was shown to act as an antagonist of innate immunity (Zhang et al., 2013) and it was proposed that variations in the efficiency of the capping reaction, more specifically that of methyltransferase activity, should be examined to determine if it could affect the ability of the virus to control the innate immune reaction (Arnold et al., 2013; Ogden et al., 2014). It will be of interest to perform similar studies with the $\lambda 2$ protein of reovirus.

Previous work has established the $\mu 2$ protein as the major determinant of the extent of interferon signaling following reovirus infection (**Zurney et al., 2009; Irvin et al., 2012; Stebbing et al., 2014**). When interferon induction by T3D^S and P4L-12 was compared by recovering supernatant from L929-infected cells (**data not shown**), both of these supernatants were able to similarly protect cells against the unrelated murine encephalomyocarditis virus (EMCV), as used in previous studies (**Sandekian et al., 2013**). This is well in accordance with the fact that there is no difference in the $\mu 2$ protein of the two viruses and thus probably no significant differences in induction of either interferon or interferon-induced genes. Furthermore, it should be stressed that the presence of a proline at position 208 indicates that these viruses are relatively, although not completely, efficient at repressing interferon signaling (**Irvin et al., 2012; Stebbing et al., 2014**) suggesting that their difference rather resides in differences of sensitivity to interferon-induced antiviral mechanisms.

The results presented herein thus further support the idea that multiple reovirus proteins are involved as determinants of reovirus' sensitivity to interferon either by differences in the modulation of interferon signaling or differences in the sensitivity of the interferon-induced antiviral effectors. In this study the $\lambda 2$ -encoding gene, L2, appears as the major determinant of the difference between T3D^S and P4L-12. The importance of multiple regulatory mechanisms directed against the interferon innate immune response has also been demonstrated in rotavirus (**Arnold et al., 2013**), another member of the *Reoviridae*, and in other unrelated viruses such as the large DNA virus vaccinia (**Perdiguero et al., 2009**) as well as important human RNA viruses such as hepatitis C (**Qashqari et al., 2013**) and influenza virus (**Garcia-Sastre, 2011**).

There are numerous evidence suggesting induction of interferon antiviral response or virus' sensitivity to this response is critical in the differential ability of a virus to replicate in, and kill, different cell types. As described in the introduction, this is also likely critical in reovirus' oncolytic ability. The possibility of modulating both the level of interferon signaling and sensitivity of reovirus strains to antiviral interferon-induced genes, by a combination of various mutations in either $\sigma 3$, $\mu 2$ and $\lambda 2$, could certainly

contribute to further optimization of viral strains for infection and killing of different cancer cell types.

5.3.6 Materials and methods

5.3.6.1 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 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 reovirus type 3 Dearing (T3/Human/Ohio/Dearing/55) was originally obtained from the American Type Culture Collection (Reovirus 3, ATCC® VR824™). The laboratory stock was derived from a pure plaque after one passage of the original stock on L929 cells. This laboratory virus stock was thereafter used between passage 3 and 5 at a low multiplicity of infection.

5.3.6.2 Sequencing of the whole viral genomes

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 to prepare reovirus virions (**Mendez et al., 2000**). The sequences corresponding to all ten genes of the wild-type laboratory stock were deposited under accession numbers KP208804 to KP208813 in GenBank. The sequences corresponding to all ten genes of the reovirus interferon-sensitive P4L-12 mutant are accessible under numbers KP208814 to KP208823.

Accession numbers for sequences used for comparisons are EF494435 to EF494444 in the nucleotide database for T3D^K; ADJ00316 to ADJ00325 in the protein

database for T3D^H; and GU991659 to GU991668 for T3D^W in the nucleotide database. The sequence of REOLYSIN® was deduced from the differences noticed between each of the genes and its reference sequence as described (**Chakrabarty et al., 2014**).

5.3.6.3 Reverse genetics

The plasmids separately harboring each of the cDNA corresponding to the 10 genes of reovirus serotype 3 Dearing, under the transcriptional control of the T7 promoter, as previously described (**Kobayashi et al., 2007**), were obtained from the laboratory of Dr Terence Dermody (Vanderbilt University, Nashville, Tennessee). To obtain virus mutants in specific genes, the corresponding plasmid was directly submitted to site-directed mutagenesis and used to recover infectious virus by transfection in BHK cells expressing the T7 RNA polymerase and rescued viruses were propagated. Kinetics of viral replication and viral titers were assessed as previously described (**Brochu-Lafontaine and Lemay, 2012**).

5.3.6.4 Immunoblotting

Infected cells were recovered by scraping in a small volume of medium and processed for immunoblotting, as previously described (**Brochu-Lafontaine and Lemay, 2012**). Immunoblotting was performed using monoclonal antibodies directed against either $\sigma 3$ (4F2), $\lambda 2$ (7F4) or $\mu 1$ (10F6) (**Virgin et al., 1991**). Images were obtained using either autoradiography on Kodak BioMax Light films or on a Typhoon Trio™ imager (GE Healthcare Life Sciences).

5.3.6.5 Determination of interferon sensitivity

Interferon sensitivity was determined by two different approaches. The reduction of titer assay was first used as previously described (**Danis et al., 1997**). Briefly, L929 cells were seeded in 96-well plates and were either left untreated or pre-treated with 200 international units (IU)/ml of mouse β -interferon (PBL InterferonSource) for 24 hours before being used in virus titration by TCID₅₀. Following virus adsorption, interferon was

added back to the pre-treated plate and the reduction in virus titer in interferon-treated cells compared to untreated cells was determined 7 days post-infection.

To measure sensitivity of viruses to different concentrations of interferon, serial twofold dilution of interferon in 96-well plates was done followed by infection with the different virus strains at the same multiplicity of infection. Plates were stained with methylene blue as previously described (**Sandekian et al., 2013**); images were obtained and quantitated using an AlphaImager HP image analyzer.

5.3.7 Acknowledgments

We thank Stéphanie Côté for technical assistance in viral titrations and Dr George Szatmari for helpful suggestions to improve the manuscript.

We thank Dr Takeshi Kobayashi and Dr Terence Dermody (Vanderbilt University, Nashville, Tennessee) for their generous gift of the plasmids used for reverse genetics. We thank Simon Léveillé and Dr John Hiscott (Lady Davis Research Institute, Montreal, Canada) for the original stock of BHK cells expressing the T7 RNA polymerase.

This work was supported by an operating grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to G.L. We also thank the “Faculté des études supérieures” of “Université de Montréal” for partial financial support to V.S.

5.3.8 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(1), e1003064. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003064.g002>
- Black, A.J., Morris, D.G., 2012. Clinical trials involving the oncolytic virus, reovirus: ready for prime time? *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 5(5), 517–520. <http://dx.doi.org/10.1586/ecp.12.53>
- Breun, L.A., Broering, T.J., McCutcheon, A.M., Harrison, S.J., Luongo, C.L., Nibert, M.L., 2001. Mammalian reovirus L2 gene and $\lambda 2$ core spike protein sequences and whole-genome comparisons of reoviruses type 1 Lang, type 2 Jones, and type 3 Dearing. *Virology* 287(2), 333–348. <http://dx.doi.org/10.1006/viro.2001.1052>
- Brochu-Lafontaine, V., Lemay, G., 2012. Addition of exogenous polypeptides on the mammalian reovirus outer capsid using reverse genetics. *J. Virol. Methods* 179(2), 342–350. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.11.021>
- 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(1), 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(9), research0038.1–0038.6. <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2001-2-9-research0038>
- Chakrabarty, R., Tran, H., Fortin, Y., Yu, Z., Shen, S.-H., Kolman, J., Onions, D., Voyer, R., Hagerman, A., Serl, S., Kamen, A., Thompson, B., Coffey, M., 2014. Evaluation of homogeneity and genetic stability of REOLYSIN® (pelareorep) by complete genome sequencing of reovirus after large scale production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98(4), 1763–1770. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-013-5499-0>
- 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(17), 8422–8438.
<http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02601-05>
- 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(7322), 452–456. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09489>
- Danis, C., Mabrouk, T., Faure, M., Lemay, G., 1997. Interferon has no protective effect during acute or persistent reovirus infection of mouse SC1 fibroblasts. *Virus Res.* 51(2), 139–149.
- Dong, H., Fink, K., Zust, R., Lim, S.P., Qin, C.F., Shi, P.Y., 2014. Flavivirus RNA methylation. *J. Gen. Virol.* 95(4), 763–778. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.062208-0>
- Garcia-Sastre, A., 2011. Induction and evasion of type I interferon responses by influenza viruses. *Virus Res.* 162(1-2), 12–18.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2011.10.017>
- 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.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003663>
- Hyde, J.L., Diamond, M.S., 2015. Innate immune restriction and antagonism of viral RNA lacking 2'-O methylation. *Virology*, Epub ahead of print.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2015.01.019>
- 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 μ 2 determines repression of interferon signaling and modulates myocarditis. *J. Virol.* 86(4), 2302–2311.
<http://dx.doi.org/10.1128/JVI.06236-11>
- Jabre, R., Sandekian, V., Lemay, G., 2013. Amino acid substitutions in σ 1 and μ 1 outer capsid proteins are selected during mammalian reovirus adaptation to Vero cells. *Virus Res.* 176(1-2), 188–198. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2013.06.007>

- Kelly, K., Nawrocki, S., Mita, A., Coffey, M., Giles, F.J., Mita, M., 2009. Reovirus-based therapy for cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.* 9(7), 817–830.
<http://dx.doi.org/10.1517/14712590903002039>
- 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(18), 9997–10003. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00883-13>
- Kindler, E., Thiel, V. 2014. To sense or not to sense viral RNA — essentials of coronavirus innate immune evasion. *Curr. Opin. Microbiol.* 20, 69–75.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2014.05.005>
- Kobayashi, T., Antar, A., Boehme, K., Danthi, P., Eby, E., Guglielmi, K., Holm, G., Johnson, E., Maginnis, M., Naik, S., 2007. A plasmid-based reverse genetics system for animal double-stranded RNA viruses. *Cell Host Microbe* 1(2), 147–157.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2007.03.003>
- Lemay, G., Tumilasci, V., Hiscott, J., 2007. Uncoating reo: uncovering the steps critical for oncolysis. *Mol. Ther.* 15(8), 1406–1407.
<http://dx.doi.org/10.1038/sj.mt.6300242>
- 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(5), 2913–2926. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.03420-13>
- Marcato, P., Shmulevitz, M., Pan, D., Stoltz, D., Lee, P.W., 2007. Ras transformation mediates reovirus oncolysis by enhancing virus uncoating, particle infectivity, and apoptosis-dependent release. *Mol. Ther.* 15(8), 1522–1530.
<http://dx.doi.org/10.1038/sj.mt.6300179>
- 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(1), 59–67.
- 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(8), 4251–4264. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.03571-13>
- 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(16), 9279–9289. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00182-13>
- Ogden, K.M., Snyder, M.J., Dennis, A.F., Patton, J.T., 2014. Predicted structure and domain organization of rotavirus capping enzyme and innate immune antagonist VP3. *Journal of Virology* 88(16), 9072–9085. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00923-14>
- Perdiguero, B., Esteban, M., 2009. The interferon system and vaccinia virus evasion mechanisms. *J. Interferon Cytokine Res.* 29(9), 581–598. <http://dx.doi.org/10.1089/jir.2009.0073>
- Qashqari, H., Al-Mars, A., Chaudhary, A., Abuzenadah, A., Damanhour, G., Alqahtani, M., Mahmoud, M., Sayed Zaki, El.M., Fatima, K., Qadri, I., 2013. Understanding the molecular mechanism(s) of hepatitis C virus (HCV) induced interferon resistance. *Infect. Genet. Evol.* 19, 113–119. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.06.025>
- Reinisch, K.M., Nibert, M.L., Harrison, S.C., 2000. Structure of the reovirus core at 3.6 Å resolution. *Nature* 404(6781), 960–967. <http://dx.doi.org/10.1038/35010041>
- 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(5), 1489–1497. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.80628-0>
- 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(2), 327–335. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2013.01.010>
- 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, U.K. pp. 173–188.

- 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(2), 1314–1323.
- Sherry, B. 2009. Rotavirus and reovirus modulation of the interferon response. *J. Interferon Cytokine Res.* 29(9), 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- β production through negative regulation of RIG-I signaling. *Cancer Res.* 70(12), 4912–4921. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4676>
- 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- κ B, induction of beta interferon, and viral spread. *J. Virol.* 88(5), 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(12), 3351–3362. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/17.12.3351>
- 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(10), e48064. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0048064.t001>
- 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(12), 6772–6781.
- 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 μ 2 proteins of different reovirus isolates. *Virol. J.* 1(1), 6. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-1-6>

- Zhang, R., Jha, B.K., Ogden, K.M., Dong, B., Zhao, L., Elliott, R., Patton, J.T., Silverman, R.H., Weiss, S.R., 2013. Homologous 2',5'-phosphodiesterases from disparate RNA viruses antagonize antiviral innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110(32), 13114–13119. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1306917110>
- Zhu, B., Yang, C., Liu, H., Cheng, L., Song, F., Zeng, S., Huang, X., Ji, G., Zhu, P., 2014. Identification of the active sites in the methyltransferases of a transcribing dsRNA virus. *J. Mol. Biol.* 426(11), 2167–2174. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2014.03.013>
- 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(5), 2178–2187. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01787-08>
- 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(2):137–143. <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1979>

5.3.9 Figure legends

Tableau VI : (Table 1). Amino acids differences between wild-type reovirus type 3 Dearing laboratory stock (T3D^S) and derived mutant P4L-12.

	Wild-type (T3D^S)	Mutant (P4L-12)	Amino acid position
λ2	T	M	636
μ1	P	S	315
	T	A	449
μNS	V	A	705
σ3	G	E	198
	M	I	221

Tableau VII : (Table 2). Amino acids differences between different reovirus type 3 Dearing

	^a T3D ^K	^b T3D ^S	^c T3D ^W	^d T3D ^H	^e Reolysin	Amino acid position
$\lambda 3$	M S N S	S	S P		L R S	979 1045 1048 1186
$\lambda 2$	G G I	E	E M	M	E R	504 509 1165
$\lambda 1$	A I A Q M G	S	T S T V D		S H	201 500 574 852 982 1017
$\mu 2$	A S R A	P Q	P Q	V Q	P Q S	122 208 342 528
$\mu 1$	E T A -- A Q A A	V T	V R V M T	I R V M	D	73 142 305 439 440 441 449 529
μNS	K A G	E V	E		E V D	180 705 707
$\sigma 1$	V T Y T	I S A	A		A A	22 249 253 408
$\sigma 3$	W G E		D	D	R K D	133 198 229

^aT3D-Kobayashi, wild-type virus from the reverse genetics system (Kobayashi et al., 2007).

^bT3D-Sandekian, original wild-type virus reported in this study

^cT3D-Wollenberg, wild-type virus (R124) used in van den Wollenberg et al., 2012.

^dT3D-Hosseini, wild-type unpublished virus sequence from NCBI database.

^eT3D-Reolysin®, wild-type virus used in clinical trials as described in Chakrabarty et al., 2014.

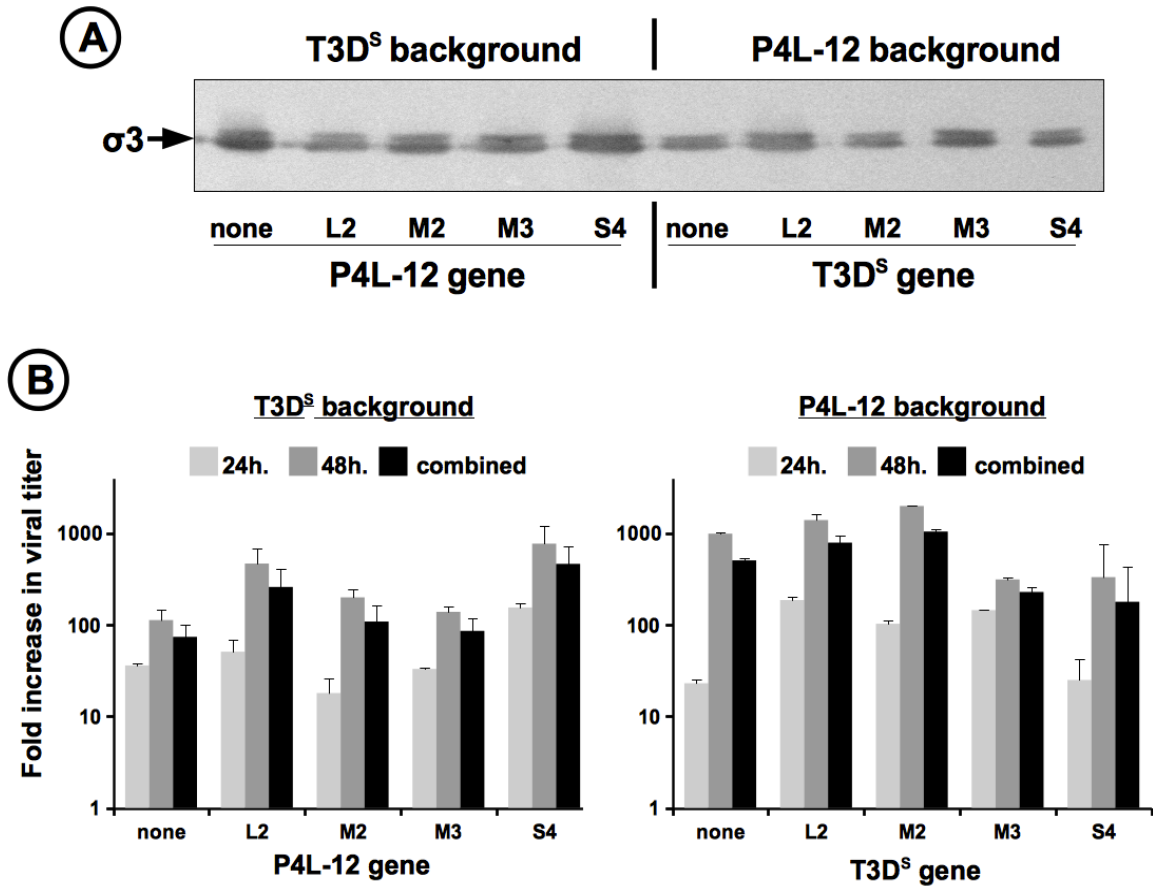


Fig. 1. Infectivity and replication of the different rescued viruses.

L929 cells were infected at a MOI of 2 TCID₅₀ units/cell. Results for the different viruses harboring either none or single P4L-12 genes in a T3D^S background or none or single T3D^S genes in a P4L-12 background are presented. (A) Proteins were recovered from infected cells at 24 hours and analyzed by immunoblotting using an anti- $\sigma 3$ monoclonal antibody, as described in Material and Methods. (B) Infected cells were recovered at either 24 or 48 hours post-infection. Cells were disrupted by three cycles of freeze-thaw (-80°C to room temperature) and virus titration was performed by TCID₅₀ on L929 cells in 96-well microplates. Results, on a logarithmic scale with error bars representing standard error of the mean, are presented as the average fold-increase in two distinct experiments at 24 hours, 48 hours, and with all four data points combined, as indicated.

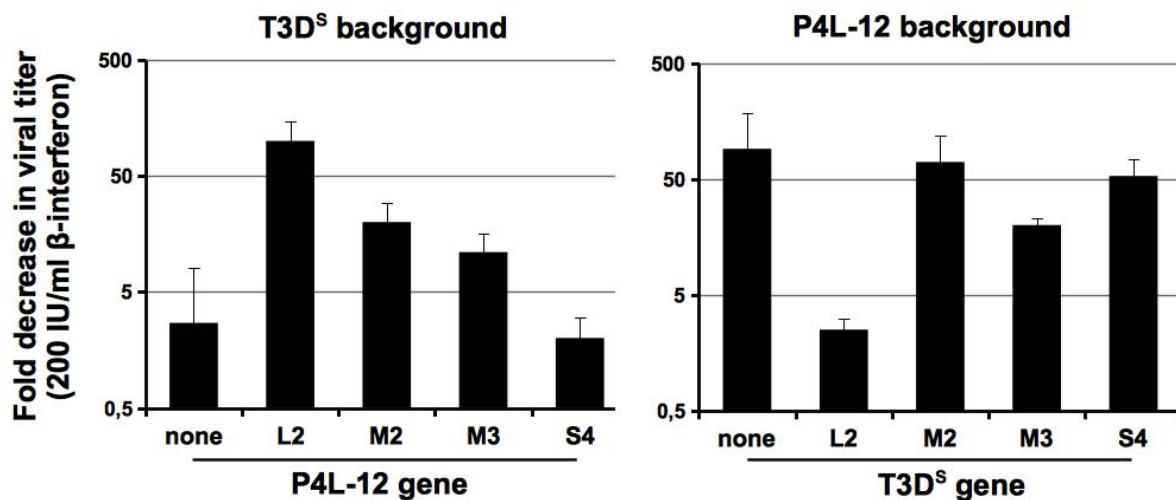


Fig. 2. Interferon sensitivity of the different rescued viruses.

The different rescued viruses, as in figure 1, were titrated using a TCID₅₀ assay in the absence or presence of 200 IU/ml of murine β -interferon, as described in Material and methods. Average fold-reduction in virus titers for independent experiments for each sample is presented on a logarithmic scale with error bars indicating the maximal value observed for each virus (n=5 for the parental viruses, n=3 for the two viruses harboring substitution of the L2 gene and n=2 for the other viruses). In both the T3D^S and P4L-12 background, only L2 gene substitution statistically altered interferon sensitivity, at p=0.002 and p=0.05 respectively using unpaired Student's t-test.

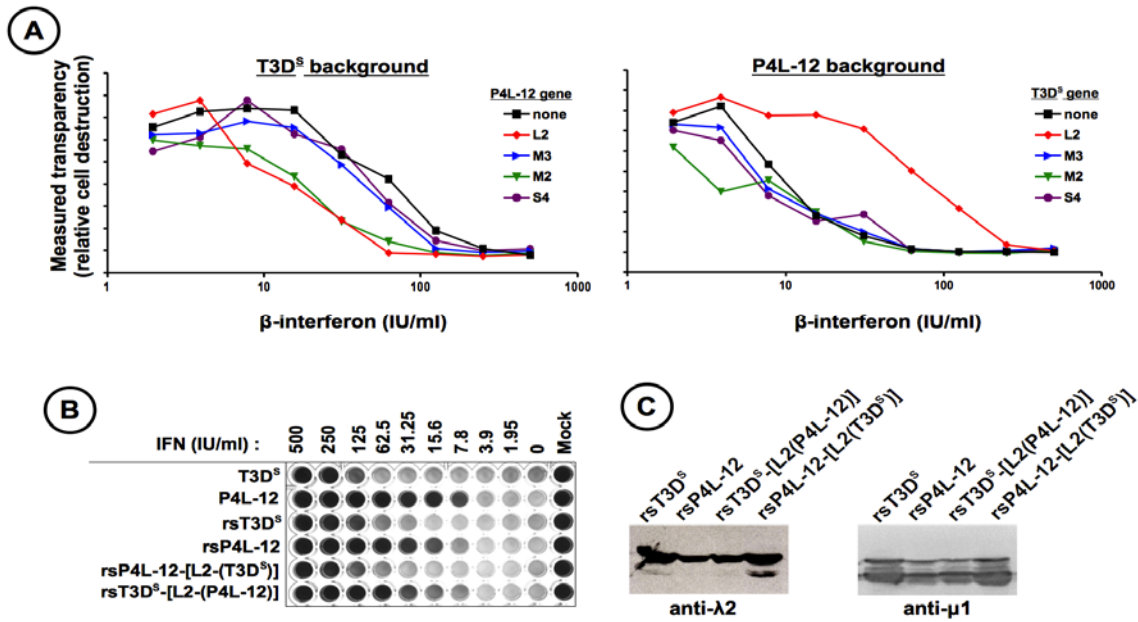


Fig. 3. Effect of different doses of interferon on the rescued viruses.

(A) L929 cells were seeded in 96-well microplates and were infected 24 hours later at a MOI of 0.05 TCID₅₀ unit/cell with the different rescued viruses. Following the one-hour adsorption period at 4°C, serial twofold dilutions of interferon were added to each well, as indicated. Cells were incubated 3 days before being fixed, stained with methylene blue, and quantified as described in Materials and methods. A representative experiment out of three independent experiments is presented. (B) Representative microwell plate comparing the two original T3DS and P4L-12 viruses with rescued viruses rsT3D^S and rsP4L-12, as well as P4L-12 harboring λ 2 from T3D^S, rsP4L-12-[L2-(T3D^S)], and reciprocally T3D^S harboring λ 2 from P4L-12, rsT3D^S-[L2-(P4L-12)]. (C) Proteins were recovered 24 hours post-infection from L929 cells infected at a MOI of 2 TCID₅₀ unit/cell with the same four viruses as in panel B. Immunoblotting analysis was then performed using either anti- λ 2 or anti- μ 1 monoclonal antibody, as described in Materials and Methods.

6 Discussion et perspectives

6.1 Résumé et discussion des différents projets

Dans l'optique de mieux comprendre les déterminants moléculaires permettant à réovirus de mieux exercer son potentiel oncolytique, nous avons entrepris divers projets en nous basant sur des techniques classiques en combinaison avec la technique de génétique inverse. Ces études ont permis de mieux comprendre de manière générale le tropisme de réovirus, soit les facteurs viraux qui influencent la capacité du virus à infecter divers types cellulaires. L'idée était surtout d'en apprendre davantage sur ce virus en utilisant cette nouvelle approche révolutionnaire qu'est la génétique inverse. Un autre aspect original de cette étude repose justement sur le fait que nous sommes un des seuls laboratoires à avoir utilisé cette technique mis à part le laboratoire où celle-ci a été décrite pour la première fois en 2007.

6.1.1 L'adaptation de réovirus sur les cellules Vero

En somme, nous sommes parvenus à adapter réovirus sur un type cellulaire auparavant jamais testé, soit les cellules Vero. Jusqu'à maintenant, les études d'adaptation ou de persistance cellulaire avec réovirus se concentraient principalement sur les cellules L929. Les mutants ainsi sélectionnés présentaient quelques fois des substitutions d'acides aminés sur la protéine sigma1, mais surtout des substitutions sur la protéine sigma3. Une de ces substitutions les plus étudiées est celle en position 354 (Y354H). Cette dernière était reliée au phénotype d'une décapsidation virale plus efficace. Étant donné que les cellules Vero décapsident mal le virus, nous nous attendions à sélectionner des virus mutants comportant des substitutions sur les protéines impliquées dans la décapsidation qui seraient potentiellement différentes à ce qui avait été sélectionné sur les cellules L929 quant à leurs positions, mais quelque peu similaires en ce qui concerne leur fonction de décapsidation.

Or, contrairement aux mutants de décapsidation classiquement étudiés, le virus adapté sur les cellules Vero (VeroAV) était résistant aux inhibiteurs de décapsidation et possédait des substitutions d'acides aminés sur les protéines sigma1 et mu1, mais pas sur sigma3. De plus, ce virus était sensible à l'IFN, phénotype possiblement sélectionné suite à l'adaptation sur des cellules défectives pour la production d'IFN. Les substitutions sur mu1 se retrouvaient dans des régions entre les hétérohexamères (E89G) et entre les différentes sous-unités de mu1 (A114V), supposant ainsi un rôle dans la stabilité de la capsid. D'ailleurs, d'autres études entreprises par d'autres groupes se concentraient justement sur des virus ayant des mutations au résidu E89 de mu1. Des révertants de mutants thermostabilisants (résistants à la chaleur), c'est-à-dire des mutants thermolabilisants, restauraient le défaut d'entrée chez les mutants originaux (substitutions E89Q, E89A et A184V) (Agosto et al., 2007; Sarkar and Danthi, 2013). Certaines de ces substitutions thermolabilisantes (E89Q, E89A) convertissaient les ISVPs en ISVPs* plus rapidement que le virus de type sauvage (Sarkar and Danthi, 2013). Il a aussi été remarqué que le virus mutant ayant le E89Q affichait un patron de digestion différent du virus de type sauvage lors d'une incubation à 37 °C, mais que ce phénotype était restauré à 28 °C. Une plus grande sensibilité ou une meilleure exposition des sites de clivage à haute température pourraient être des explications possibles pour ce phénotype. Aussi, des virus avec des substitutions en E89 (E89A et E89Q) engendraient des petites plages de lyse (Sarkar and Danthi, 2013), ce qui concorde avec la morphologie des plages de lyse de VeroAV. En ce qui concerne les substitutions sur sigma1, il a été rapporté que le résidu N198 est impliqué dans la fixation aux acides sialiques, puisqu'une substitution en N198E abolissait le phénotype (Chappell et al., 1997; Dermody et al., 1990; Reiter et al., 2011).

6.1.2 La caractérisation du VeroAV

Pour faire suite à cette étude, nous voulions élucider le rôle de ces substitutions retrouvées sur sigma1 et mu1 du VeroAV. Étant donné la position des différentes substitutions sur sigma1, nous voulions déterminer si, dans un premier temps, la fixation à la surface cellulaire était affectée. Effectivement, les expériences ont démontré que VeroAV se fixait mieux à la surface des cellules Vero et plus spécifiquement à leurs

acides sialiques. De plus, les évidences tendent à démontrer que lors de l'adaptation aux cellules Vero, réovirus sélectionne d'abord des substitutions sur sigma1 et ensuite sur mu1 pour stabiliser le virus. En effet, lors d'un autre essai d'adaptation de réovirus aux cellules Vero où le virus fut récolté après 8 semaines au lieu de 21 semaines, celui-ci comportait déjà une des deux substitutions sur sigma1 (N198K) mais aucune substitution sur mu1 ne fut sélectionnée. De plus, lors de la construction par clonage du plasmide codant pour la protéine mu1 à partir de la séquence virale, 5 clones sur 10 n'avaient pas la bonne combinaison de substitution reflétant ainsi la possible hétérogénéité du gène M2 au sein de cette population virale du VeroAV. Nous avons également remarqué que le virus ayant les substitutions de sigma1-AV et mu1-S semble avoir une infectivité moindre que les autres combinaisons de virus créés par génétique inverse (voir figure 4 du deuxième article), ce qui renforce l'idée que le mu1-S a probablement dû subir des mutations compensatoires afin d'assurer la stabilité du VeroAV.

Dans un deuxième temps, nous voulions déterminer si les substitutions présentes sur mu1 pouvaient affecter la décapsidation du virus. En effectuant une cinétique *in vitro* avec la chymotrypsine, nous avons conclu que le patron de digestion du VeroAV est effectivement différent de celui du T3D^S. On distingue clairement que pour le VeroAV, même si sigma3 n'est pas encore complètement dégradé, il y a une disparition progressive de mu1, mais curieusement sans qu'il y ait accumulation de la forme mu1-delta. Ceci ressemble au phénotype du T3D^K. Cependant, notre T3D^S ressemblerait davantage à un T1L. Il a été démontré que la nature du résidu A305 serait responsable de ce phénotype, puisqu'il est impliqué dans la conversion d'ISVP à ISVP*. Lorsque remplacé par une valine, comme c'est le cas du T3D^S et du VeroAV, le patron de clivage du mu1 du sérotype 3 devient similaire à celui du sérotype 1. Cet acide aminé se situe dans une région de contact entre les monomères de mu1 et les trimères, ce qui expliquerait l'importance de ce résidu dans la stabilité de la structure (Madren et al., 2012). Les auteurs de cette étude ont également remarqué que de faibles concentrations de chymotrypsine affectaient la formation d'ISVP en ISVP*. Curieusement, il y aurait formation d'un intermédiaire similaire au ISVP* sans passer par la forme ISVP. De plus, la conversion de ce type d'ISVP* en core se ferait beaucoup plus rapidement que lors

d'incubation avec de fortes concentrations de chymotrypsine (Madren et al., 2012). Donc, le fait que le patron de clivage du VeroAV ressemble davantage à un T3D^K malgré la présence d'une valine en position 305 pourrait s'expliquer par la présence des autres substitutions de mu1 sur VeroAV. Tel que décrit précédemment, les résidus en E89 et A114 seraient impliqués dans la stabilité de la capsid et dans la conversion d'ISVP en ISVP*.

Nous avons également observé que pour une même quantité de virus, la quantité de sigma1 variait selon le contexte sigma1/mu1. Il semblerait que la fonction et l'incorporation de sigma1 soient affectées par la nature des résidus présents sur ces deux protéines. Nous avons toutefois remarqué que malgré une plus grande présence de sigma1 par virus dans certaines combinaisons de sigma1/mu1, cela n'affectait pas l'infectivité sur les cellules Vero.

Finalement, la génétique inverse a permis de reconstruire un VeroAV qui se comporte de la même façon que le virus original en ce qui concerne la fixation aux acides sialiques, l'infection des cellules Vero et la décapsidation du virus. Les simples mutants créés ont, quant à eux, permis de conclure que les substitutions de sigma1 de VeroAV sont en majeure partie responsables des phénotypes liés à la meilleure fixation des acides sialiques et à l'infection des cellules Vero, mais que la nature de mu1 a certainement un rôle stabilisant à jouer. Il est probable que la nature de la protéine lambda2 soit importante dans cette stabilisation étant donné qu'elle possède plusieurs points de contact avec mu1 et avec sigma1 (Liemann et al., 2002; Middleton et al., 2007; Zhang et al., 2005). Les substitutions présentes sur mu1, comme celle retrouvée en position 89, pourraient donc affecter de façon indirecte l'exposition de sigma1. D'ailleurs, une étude récente a démontré que la fonction de sigma1 pouvait être altérée par des changements dans la protéine lambda2 (Shmulevitz et al., 2012) et il avait déjà été rapporté que divers phénomènes attribués à la protéine sigma1 tels que l'apoptose et la neurovirulence pouvaient être modulés par différentes modifications au sein de la protéine mu1 (Clarke et al., 2001; Hrady et al., 1982; Rodgers et al., 1997; Tyler et al., 1996).

Ensemble, ces deux études se concentrant sur VeroAV ont démontré qu'il est possible d'adapter réovirus à d'autres modèles cellulaires tels que les cellules Vero et que des phénomènes autres qu'une meilleure décapsidation peuvent être impliqués. Une meilleure fixation aux acides sialiques est d'autant plus intéressante dans un contexte d'optimisation du potentiel oncolytique de réovirus que certaines cellules cancéreuses expriment un faible niveau de JAM-A, l'autre récepteur de réovirus (Van Den Wollenberg et al., 2009; van den Hengel et al., 2013; van Houdt et al., 2008; van den Wollenberg et al., 2012).

Sachant que VeroAV est sensible à l'IFN et que, dans le cas du P4L-12, ce phénotype est corrélé avec une meilleure discrimination entre les cellules parentales et transformées, il serait intéressant d'étudier le potentiel oncolytique de VeroAV. Quelques expériences dans des modèles de cellules parentales et transformées telles que les NIH-3T3 et NIH-Ras, qui seront décrites plus bas, seraient à envisager.

Utiliser des techniques classiques telles que l'adaptation cellulaire en combinaison avec la génétique inverse sont des idées intéressantes dans un contexte d'optimisation de l'oncolyse de réovirus puisqu'elles permettent d'avoir une meilleure compréhension du tropisme et des résidus impliqués dans divers phénomènes importants pour une réplication virale efficace. Sachant cela, il serait intéressant d'adapter réovirus à des cellules cancéreuses afin d'étudier les virus et les phénotypes sélectionnés.

6.1.3 Étude d'un mutant de réovirus et de sa sensibilité à l'interféron

Dans un autre projet, nous nous sommes intéressés à un virus qui avait préalablement été sélectionné par mutagenèse chimique au laboratoire. Ce virus, nommé P4L-12, possédait une sensibilité accrue à l'IFN, phénotype corrélé avec un meilleur blocage dans les cellules parentales, et par le fait même, un meilleur potentiel oncolytique en culture cellulaire. Nous avons séquencé tous les gènes de notre virus T3D^S ainsi que du virus P4L-12 et avons identifié des substitutions dans 4 gènes, soit M2, M3, S4 et L2. Nous avons ensuite tiré avantage de la technique de génétique inverse et nous avons pu récupérer le même phénotype de sensibilité à l'IFN qui avait été décrit pour le P4L-12

original avec le virus correspondant créé par génétique inverse. Les simples mutants qui ont ensuite été récupérés nous ont permis de conclure que la substitution sur L2 (T636M) est principalement responsable du phénotype de sensibilité à l'IFN. Peu d'études ont clairement relié la sensibilité à l'IFN de réovirus avec la protéine lambda2 (Sherry et al., 1998). De plus, nous avons remarqué que cet acide aminé se retrouve dans le domaine ARN-méthyltransférase de la protéine, ce qui n'avait jamais été relié avec la sensibilité à l'IFN de réovirus. Selon la séquence, ce résidu se retrouverait dans la région 2'-O méthyltransférase. En affectant l'activité de la synthèse de la coiffe de cette enzyme, on peut supposer que certains ARN viraux ne seraient pas protégés contre la détection par des protéines cellulaires. Ceci pourrait stimuler la production de molécules antivirales ou leur sensibilité envers celles-ci. Notons toutefois que selon nos résultats, P4L-12 n'induit pas plus d'IFN que T3D^S et que l'effet serait donc plutôt au niveau de la sensibilité.

Nous avons donc su démontrer encore une fois l'utilité de combiner des approches classiques, telles que la mutagenèse chimique, et la génétique inverse afin de comprendre les mécanismes importants impliqués dans le tropisme et dans la réplication virale. De plus, chez P4L-12, le fait que la sensibilité à l'IFN soit corrélée avec une meilleure discrimination entre les cellules parentales et transformées laisse supposer qu'un virus comportant uniquement la substitution T636M sur lambda2 aurait également un bon potentiel oncolytique. D'autres études seraient à prévoir en ce sens pour confirmer cette possibilité. Il serait également intéressant d'étudier plus en détail l'activité méthyltransférase de lambda2 afin de mieux comprendre son rôle dans la sensibilité à l'IFN de P4L-12. Des essais de synthèse et de méthylation de la structure coiffe *in vitro* à partir de cores préparés à partir des virus T3D^S et de P4L-12 pourraient être envisagés. On pourrait également examiner la méthylation de la coiffe des ARN viraux dans la cellule infectée tel que démontré dans une étude récente sur le métapneumovirus (Zhang et al., 2014). Dans cette dernière étude, les auteurs ont d'ailleurs relié le mauvais fonctionnement de la 2'-O méthyltransférase à une sensibilité accrue à l'IFN pour le métapneumovirus (Zhang et al., 2014).

6.2 Avenues connexes intéressantes

6.2.1 L'aspect décapsidation de P4L12

Avant de réaliser que notre virus T3D^S était différent du T3D^K, nous avons entamé certaines études en ce qui concerne la capacité de décapsidation de P4L-12. Ce faisant, les virus créés par génétique inverse de la prochaine section ne comportent pas le bon fond génétique (fond génétique de T3D^K). Par contre, certains résultats préliminaires sont tout de même intéressants puisque le phénotype de décapsidation du virus portant les substitutions sur mu1 et sigma3 reproduit ce qui a été observé avec le P4L-12 original.

Une caractéristique du P4L-12 que nous avons observée, autre que sa sensibilité à l'IFN, est sa capacité à former des plages de lyse sur cellules Vero sans chymotrypsine, un peu à la manière du VeroAV. Rappelons que ces cellules sont restrictives à la décapsidation virale et, en absence de chymotrypsine, ne permettent normalement pas la formation de plages par le virus de type sauvage, que ce soit le T3D-S ou le T3D-K (Golden et al., 2002). Nous avons donc émis l'hypothèse que P4L-12 pourrait être un mutant de décapsidation, étant donné sa capacité à former des plages de lyse dans ces conditions. Cependant, en présence de chymotrypsine, P4L-12 forme des petites plages de lyse comparativement au virus de type sauvage. Ce phénotype est également confirmé avec le P4L-12 de génétique inverse comportant les substitutions sur sigma3 et mu1 seulement dans le fond génétique de T3D^K, nommé T3D^K(mu1-P4L-12/sigma3-P4L-12). Les simples mutants de génétique inverse, T3D^K(mu1-T3D^S/sigma3-P4L-12) et T3DK(mu1-P4L-12/sigma3-T3D^S) indiquent que la substitution sur mu1 (P315S) serait probablement responsable de ce phénotype.

D'autres résultats préliminaires obtenus par immunobuvardage suite à une infection de cellules Vero à faible multiplicité d'infection en présence ou en absence de chymotrypsine confirment cette conclusion (**Fig. 1A**). On constate que contrairement aux virus de type sauvages (T3D^S et T3D^K et T3D^K(mu1-T3D^S/sigma3-T3D^S), les virus mutants P4L-12, T3D^K(mu1-P4L-12/sigma3-P4L-12) et le simple mutant de mu1 T3D^K(mu1-P4L-12/sigma3-T3D^S) infectent bien les cellules Vero avec et sans chymotrypsine, suggérant leur

meilleure décapsidation dans ce type de cellules. Un contrôle positif de mutant de décapsidation classique, Pi3.1 (obtenu par persistance sur cellules L929 et possédant une mutation sur la protéine sigma3 (Y354H) responsable du phénotype (Wetzel et al., 1997; Wilson et al., 2002)) se comporte toutefois de la même façon qu'un virus de type sauvage dans ce type d'expérience. Cette observation avait déjà été rapportée dans une autre étude (Golden et al., 2002). Ceci indique, de façon préliminaire, que les virus ayant le $\mu 1$ de P4L-12, ne seraient pas des mutants de décapsidation classique comme c'est le cas du Pi3.1. Cependant, le simple mutant sigma3 de P4L-12, soit le T3D^K($\mu 1$ -T3D^S/ $\sigma 3$ -P4L-12) se comporte de façon intermédiaire. En effet, ce dernier semble démontrer une légère décapsidation facilitée selon cette expérience. Ces données indiquent donc que, comme c'était le cas du VeroAV, P4L-12 n'est pas un mutant de décapsidation classique, malgré le fait qu'il soit capable de former des plages en absence de chymotrypsine sur cellules Vero. Ces résultats suggèrent aussi que la mutation sur $\mu 1$ est responsable de ce phénotype. Le mutant ayant le $\sigma 3$ de P4L-12 pourrait être un mutant de décapsidation, mais d'autres expériences seraient requises pour le confirmer.

Ces résultats ont également été confirmés par la cytométrie en flux (**Fig. 1B**), qui est plus précise et plus rapide que l'immunobuvardage. Ces données confirment encore une fois que la substitution P315S sur $\mu 1$ serait responsable d'une meilleure infection sur cellules Vero. Notons qu'il aurait été intéressant d'avoir le virus Pi3.1 dans cette expérience pour mieux comparer ces résultats, surtout en ce qui concerne la possibilité que le simple mutant de sigma3 soit un mutant de décapsidation. Il serait effectivement intéressant d'en apprendre davantage sur le rôle des substitutions sur sigma3 car en plus d'une modification au résidu M221I, on en retrouve une autre en G198E. Cette dernière modification a été précédemment décrite comme étant capable de réverter le phénotype de décapsidation facilitée du mutant ayant le Y354H (Doyle et al., 2012). Il serait intéressant de voir si dans ce contexte, le résidu G198E a un rôle à jouer sur la substitution M221I, puisque dans ces résultats préliminaires, le virus semble conserver, du moins partiellement, sa décapsidation facilitée lorsque ces deux substitutions sont présentes.

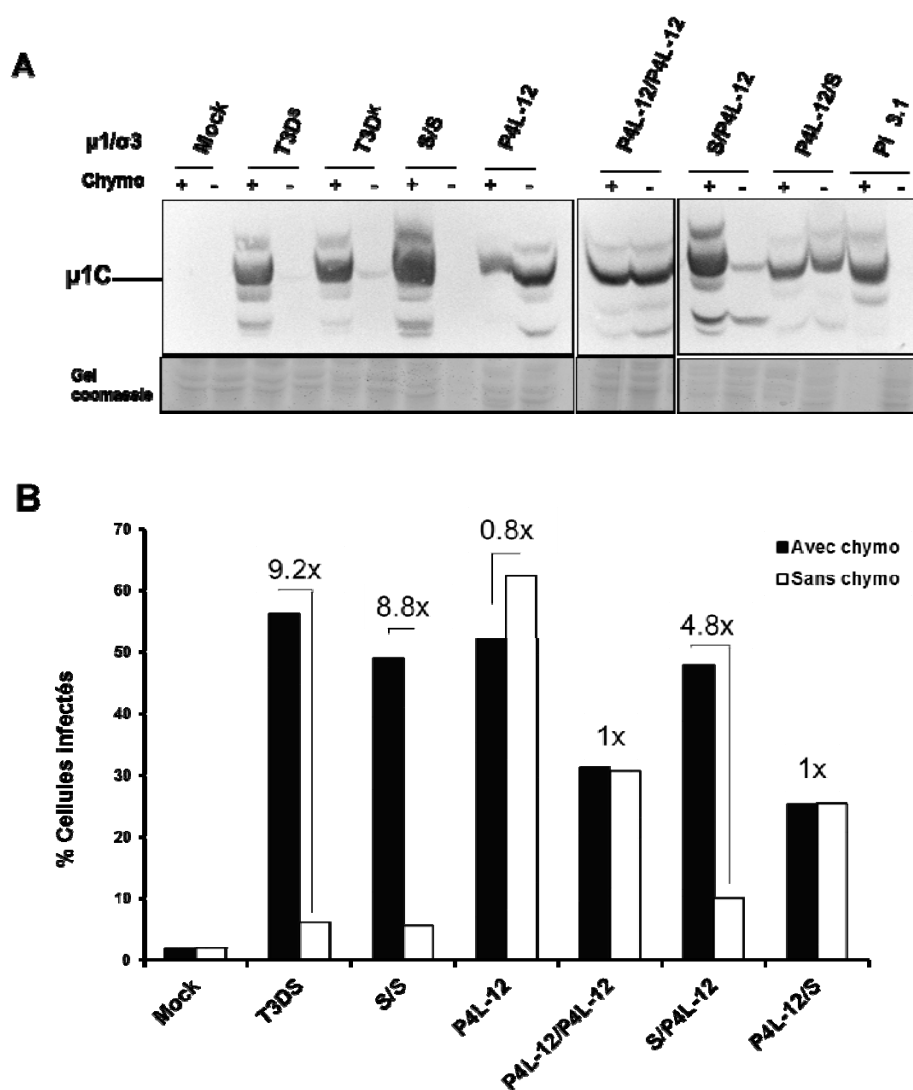


Fig. 1. Infections à une M.I. de 0.5 UFP/cellule des différents mutants de P4L-12 sur des cellules Vero en présence ou en absence de chymotrypsine (5 μ g/ml).

A) Immunobuvardage de type Western blot. Les protéines ont été récoltées 30h post-infection et analysées pour la présence de la protéine $\mu 1C$ tel que décrit précédemment. B) Pourcentage de cellules infectées détectées par cytométrie en flux. Les cellules ont été récoltées 24h post-infection et analysées pour la détection intracellulaire d'antigènes de réovirus tel que décrit précédemment. La différence entre les conditions avec et sans chymotrypsine est indiquée au-dessus des données.

Aussi, nous avons pu confirmer que le virus P4L-12 original ne se comporte pas comme un mutant de décapsidation classique, étant donné qu'il demeure sensible à un inhibiteur de cathepsines (E-64), contrairement au mutant de décapsidation classique Pi3.1 ou au virus de génétique inverse ne comportant que le Y354H sur sigma3 dans le contexte du T3D^K (Fig. 2) (Baer and Dermody, 1997).

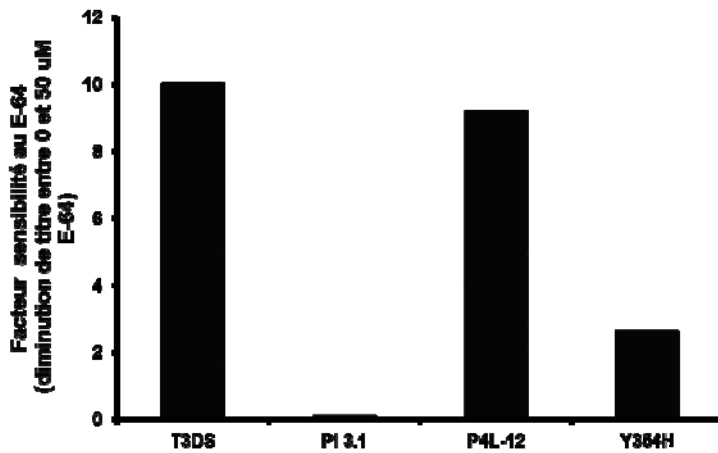


Fig. 2. Sensibilité de P4L-12 à un inhibiteur de protéases (E-64).

Les cellules L929 ont été infectées à une M.I. de 2 UFP/cellule en absence ou en présence de 50mM d'E-64. Les cellules infectées ont été congelées 24h post-infection et le titre viral a ensuite été mesuré. Les résultats sont présentés comme la différence entre les conditions avec et sans l'inhibiteur.

Étant donné la nature des mutations de P4L-12, il est possible qu'un autre phénomène, tel que l'entrée du virus, plutôt que sa décapsidation, soit altéré (Danthi et al., 2010; Sarkar and Danthi, 2010). En effet, la substitution P315S, située dans la région delta de mu1, pourrait affecter la sortie du virus hors de l'endosome. Des tests d'hémolyse d'érythrocytes ou de résistance à la chaleur sur des ISVP pourraient donc être envisagés afin de mesurer la fonction de mu1, lors de l'entrée du virus (Danthi et al., 2010; Sarkar and Danthi, 2010). Une résistance à la chaleur indiquerait une surstabilisation de mu1 ce

qui affecterait négativement la pénétration membranaire en altérant la conversion de la forme ISVP en ISVP* (Agosto et al., 2007; Chandran et al., 2002, 2003; Danthi et al., 2008a; Middleton et al., 2002). De plus, des substitutions conférant cette résistance (A319E et D371A) se trouvent dans la même région que la mutation de mu1-P315S de P4-L12, soit la région delta de mu1 (Agosto et al., 2007; Wessner and Fields, 1993). Pour tester cette hypothèse, il faudrait transformer les virions en ISVP *in vitro* par chymotrypsine et les incubés à la chaleur (52 °C) pendant différentes périodes de temps. L'effet de ces conditions pourra alors être comparé aux conditions standard et évalué par titrage. L'entrée peut également être examinée plus directement en mesurant le taux d'hémolyse d'érythrocytes. Les formes ISVP des différents virus pourraient être mises en présence de globules rouges de veau. L'hémolyse sera alors mesurée par absorbance du surnageant (contenant l'hémoglobine relâchée) en comparaison avec des contrôles de globules rouges sans virus incubés avec ou sans Triton X-100 (Danthi et al., 2008b; Kim et al., 2011a; Zhang et al., 2009).

À titre d'information, la figure suivante (**Fig. 3**) illustre la localisation des différentes substitutions de mu1 et sigma3 retrouvées sur P4L-12 en comparaison avec d'autres substitutions déjà connues et documentées.

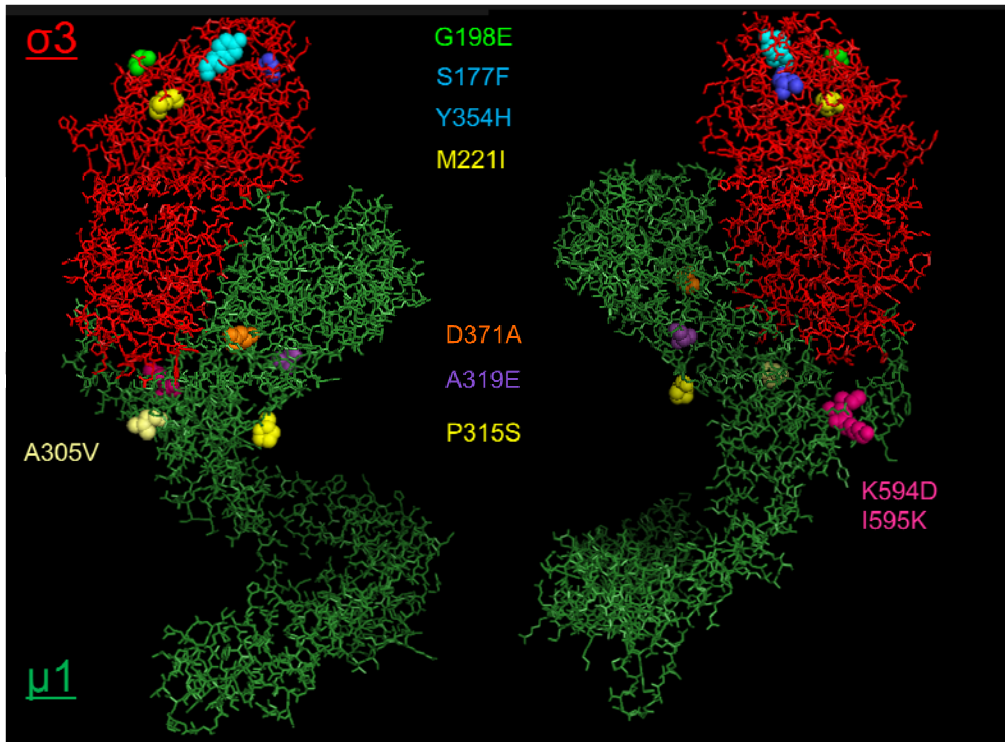


Fig. 3. Positions des différentes substitutions d'acides aminés de P4L-12 comparé au T3D^S (M221I et G198E sur sigma3 et P315S sur mu1) par rapport à d'autres substitutions connues.

A305V est un résidu variable entre les différents T3D de type sauvage. S177F et Y354H sont des substitutions isolées sur des mutants de persistance chez les cellules SC1 et L929 respectivement. A319E est un mutant d'entrée. D371A et K594D sont des mutants d'entrée qui surstabilisent la région delta de mu1 (incapacité d'effectuer la transformation d'ISVP en ISVP* correctement). K594D et I595K sont impliqués dans l'activation de l'apoptose. Adaptée de (Liemann et al., 2002).

6.2.2 Le potentiel de discrimination de P4L-12 entre les cellules NIH parentales et transformées

Un autre aspect qui serait définitivement important d'examiner est la capacité des différents virus de P4L-12 construits par génétique inverse à discriminer entre les cellules parentales et les cellules transformées par Ras. Tel qu'utilisé originalement dans l'article

sur P4L-12 (Rudd and Lemay, 2005), les cellules NIH-3T3 parentales et NIH-Ras seraient de bons modèles pour évaluer, dans un premier temps, le potentiel oncolytique de ces virus. Les cellules ont été fraîchement transformées par transduction à l'aide d'un vecteur rétroviral pour Ras (G12V). Nous avons également transformé la même lignée de cellules, NIH-3T3, avec l'oncogène CUG2 (Cancer Upregulated Gene 2) qui a préalablement été cloné dans le vecteur rétroviral dans notre laboratoire. Il a été démontré que cet oncogène active indirectement les voies de signalisation de Ras et permet également la réplication et l'oncolyse par réovirus (Park et al., 2010). Il sera donc intéressant de vérifier les résultats obtenus avec nos différents mutants, mais en utilisant cet autre oncogène. Les cellules pourraient être infectées à faible et forte multiplicité et l'infection sera mesurée par titrage, immunobuvardage et cytométrie en flux sur des cellules semi-perméabilisées maintenant que ces techniques sont bien établies au laboratoire.

6.2.2.1 Autres lignées cellulaires intéressantes

Un second modèle cellulaire pourra aussi être utilisé pour valider nos conclusions. Des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) immortalisés par inactivation (« knockout ») des gènes suppresseurs de tumeurs p53 ou ARF (p19), ont été transformés avec Ras (G12V) par transduction rétrovirale (**Fig. 4**). Ce modèle s'avère intéressant puisque plusieurs cellules cancéreuses humaines possèdent des mutations sur p53 ou ARF (Sherr and Weber, 2000; Sigal and Rotter, 2000; Vassilev, 2007; Weber et al., 2000). Notons qu'une souris knock-out pour la protéine p53 se développe normalement mais peut développer des tumeurs spontanément (Donehower et al., 1992). La protéine p53 est également impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires reliées à des réponses au stress, telles que la transcription d'IRF9 lors d'une infection virale, l'activation de PKR, l'activation de l'apoptose, la réponse au dommage à l'ADN, l'hypoxie, l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence, etc. (Brady and Attardi, 2010; Brown et al., 2009; Muñoz-Fontela et al., 2008; Takaoka et al., 2003; Yoon et al., 2009). Sommairement, elle est régulée par l'ubiquitine ligase MDM2 qui envoie p53 à la dégradation. P53 est également impliquée dans la régulation de la transcription de MDM2, ce qui provoque donc une boucle de rétroaction. La protéine p53 est également régulée par la protéine ARF. Celle-ci

inhibe MDM2, empêchant alors la dégradation de p53 (Bringold and Serrano, 2000; Brown et al., 2009; Sherr and Weber, 2000). Un knock-out de p53 ou d'ARF affecte donc grandement diverses signalisations cellulaires et induit l'immortalisation dans celles-ci. L'infection par réovirus dans ces cellules pourra être mise en évidence par immunobuvardage, cytométrie en flux sur cellules semi-perméabilisées et titrage des virus produits. En s'inspirant des études précédentes de persistance sur les cellules cancéreuses (Alain et al., 2006; Kim et al., 2007), il serait intéressant d'adapter réovirus sur ces lignées cellulaires MEF knock-out et voir quel type de mutations serait sélectionné.

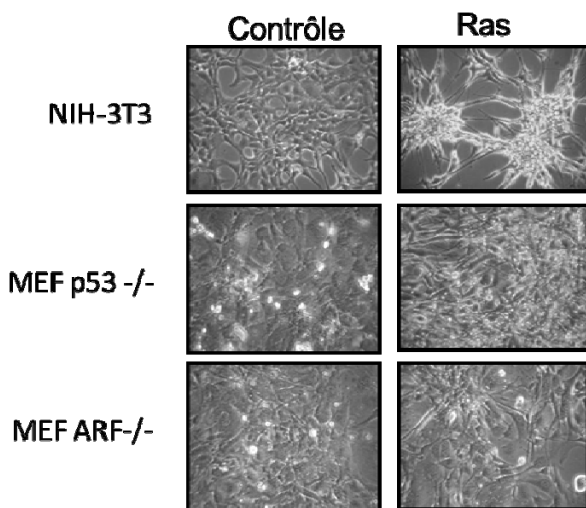


Fig. 4. Images de différentes cellules parentales et transformées par l'oncogène Ras établies au laboratoire.

Des résultats préliminaires d'immunobuvardage démontrent que le T3D^S et P4L-12 se répliquent déjà bien sur les cellules MEFp53^{-/-} et p19^{-/-} et que l'ajout de Ras a peu d'effet, indiquant que l'immortalisation par le knock-out de ces protéines serait suffisante à la répllication de réovirus (**Fig. 5**). Ces résultats sont à valider en cytométrie en flux et par titrage, et ce, à différentes multiplicités d'infection. Néanmoins, ceci concorde avec les résultats d'une étude qui a démontré que réovirus infecte préférentiellement les cellules MEF p53^{-/-} comparativement aux cellules MEF de type sauvage (Kim et al.,

2010). Dans la Fig.5A, on remarque des niveaux similaires de production de protéines virales, que ce soit pour le T3D^S ou le P4L-12, et ce peu importe si la cellule MEF knock-out possède ou non l'oncogène Ras. En 5B, nous avons utilisé le virus H8-2, qui était le virus contrôle de type sauvage utilisé dans l'étude originale de P4L-12 (Rudd and Lemay, 2005). Ici aussi, on observe que malgré une plus faible multiplicité d'infection que dans la figure 5A, l'oncogène Ras a peu d'effet lors d'une infection sur les cellules MEF knock-out pour ARF (p19). Notons que nous obtenons les résultats attendus avec le modèle NIH-3T3 et NIH-Ras, où P4L-12 est mieux bloqué dans les cellules parentales et se réplique bien dans les cellules transformées par Ras. Cependant, il y avait eu beaucoup de lyse cellulaire dans le cas des MEF p19^{-/-} lorsqu'infectées avec P4L-12 et donc une partie des protéines virales n'a pu être récoltée et détectée lors de l'expérience. Dans la figure 5C, on répète l'expérience à deux faibles multiplicités d'infection et à deux temps différents pour les cellules p53^{-/-} et p19^{-/-} et on remarque qu'à 24h post-infection, il y a une meilleure répllication dans les p19^{-/-} que dans les p53^{-/-}. Nous pensons que d'autres expériences doivent être effectuées pour confirmer cet aspect, qui pourrait ne pas être nécessairement significatif à ce stade-ci. Dans l'autre condition (M.I.=0.5, 48h p.i.) il semble y avoir une légère augmentation des protéines virales dans les cellules transformées avec l'oncogène Ras comparativement aux cellules parentales, mais il demeure que la répllication est loin d'être bloquée dans ces cellules. Tel que mentionné précédemment, d'autres expériences sont à prévoir pour mieux discerner la répllication de réovirus dans ces cellules.

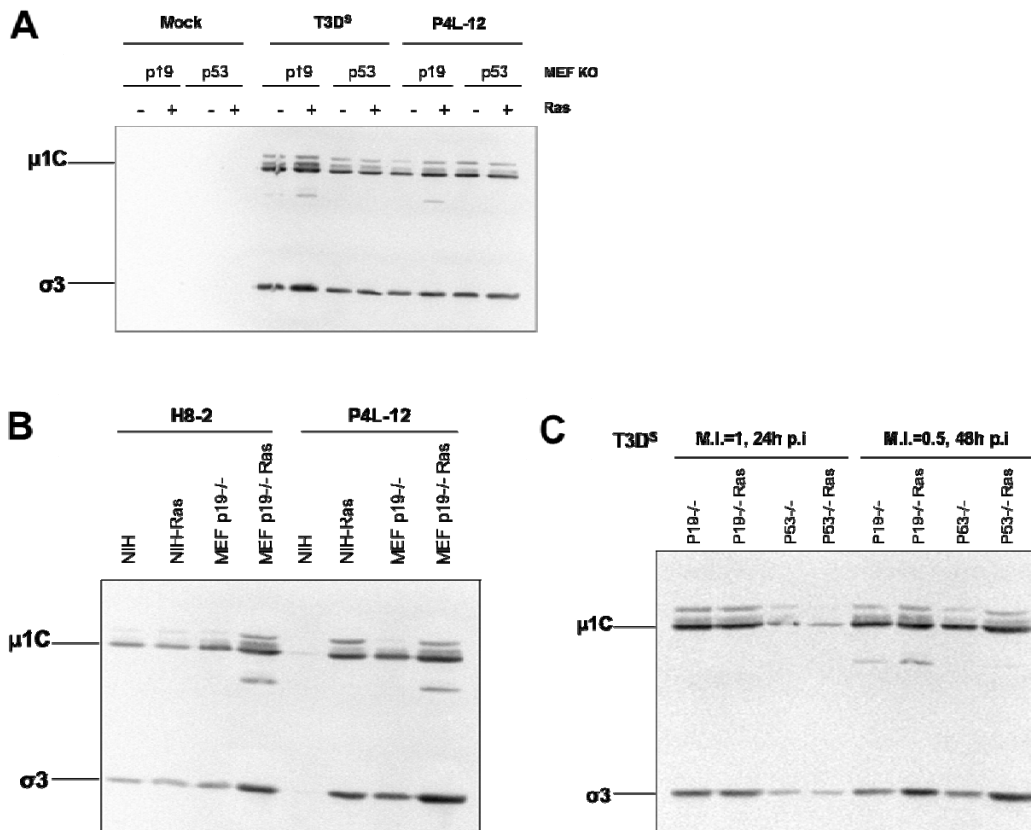


Fig. 5. Immunobuvardage sur différentes lignées de cellules parentales et transformées par l'oncogène Ras infectées par des virus de type sauvage ou le virus mutant P4L-12.

A) Les cellules furent infectées à une M.I. de 10 UFP/cellule et les protéines furent récoltées 24h post-infection. B) Les cellules furent infectées à une M.I. de 0.5 UFP/cellule et les protéines furent récoltées 48h post-infection. (Le virus H8-2 est le virus contrôle de type sauvage isolé lors de l'établissement du P4L-12 (Rudd and Lemay, 2005)). C) Les cellules furent infectées et les protéines furent récoltées aux conditions indiquées. Les protéines ont été analysées pour la présence de la protéine μ 1C et sigma3 tel que décrit précédemment.

Il est possible que les expériences effectuées sur les cellules MEF knockout soient difficiles à interpréter, étant donné que des voies de signalisation importantes pour plusieurs phénomènes tels que l'apoptose, transcription de gènes, le contrôle de la progression du cycle cellulaire, etc. sont perturbées (Levine and Oren, 2009). Néanmoins,

ces cellules demeurent un outil intéressant pour la caractérisation du potentiel oncolytique de réovirus car, tel que mentionné précédemment, plusieurs tumeurs humaines présentent des mutations au niveau des gènes codant pour les protéines p53, ARF et Ras.

6.2.3 Sensibilité à l'IFN de différents virus

Un autre aspect intéressant à étudier serait la sensibilité à l'IFN de différents virus étant donné que ce phénotype est relié à une meilleure discrimination entre les cellules parentales et transformées (Rudd and Lemay, 2005). Il est donc important de mieux comprendre et identifier les résidus importants pour ce phénotype.

6.2.3.1 VeroAV

Dans le premier article, nous avons observé que le VeroAV possédait lui aussi une sensibilité accrue à l'IFN (Jabre et al., 2013). Cet aspect n'a malheureusement pas été davantage étudié. Cependant, nous avons déjà entamé le séquençage complet du VeroAV et il sera intéressant de voir si des substitutions d'acides aminés se retrouvent sur la protéine lambda2 comme c'était le cas avec P4L-12. Quelle que soit la nature des substitutions retrouvées sur VeroAV, il serait intéressant de le reconstruire par génétique inverse, ainsi que les différents simples mutants lorsque sa séquence sera complétée. De cette façon, nous pourrions déterminer si d'autres résidus que ceux observés chez P4L-12 sont impliqués dans cette sensibilité à l'interféron du VeroAV.

6.2.3.2 T3D^K

Au travers nos études, nous avons remarqué que le T3D^K et le T3D^S original n'affichaient pas le même degré de sensibilité à l'IFN, ce qui était embêtant puisque ce sont les virus qui étaient utilisés comme contrôles dans les différentes expériences menées au laboratoire. C'est d'ailleurs pour cette raison que nous avons séquencé notre T3D^S et l'avons reconstruit par génétique inverse. Ceci permettait alors une comparaison plus juste avec nos virus mutants tels que P4L-12. Nous avons donc en main tous les plasmides pour élucider le ou les gènes responsables de cette sensibilité à l'IFN du T3D^S

comparativement au T3D^K. Il faudrait procéder de la même manière que dans notre étude sur P4L-12 c'est-à-dire reconstruire les simples mutants en remplaçant un à un chaque gène dans les deux fonds génétiques. Il y aurait donc le virus T3D^K avec soit le L1, L2, L3 S1, M1, M2 et le M3 de T3D^S et vice-versa.

6.2.4 La notion de « type sauvage »

Étant donné que le virus T3D^K est le virus de référence lors de la construction des virus par génétique inverse, cela peut poser problème dans certaines études comme nous l'avons démontré dans cette thèse. On peut donc se questionner à savoir quelle serait donc la souche exacte du type sauvage du réovirus T3D?

Étant un virus à ARN, réovirus est plus sujet à changement que les virus à ADN par exemple. Toutefois, le mode de transcription de réovirus est plus fiable contrairement à ce qu'on retrouve chez plusieurs virus à ARN. Dans l'article 3 de cette thèse, on démontre au tableau 2 qu'il y a tout de même une grande variété de souches différentes pour le sérotype T3D. Le virus varie d'un laboratoire à l'autre, et ce, même s'il provenait du même laboratoire d'origine. Ceci démontre la diversité de réovirus T3D que l'on désigne « type sauvage ». Ces variations ne sont pas nécessairement responsables de différences phénotypiques, mais il demeure qu'elles pourraient expliquer certaines variations comme c'est le cas avec notre T3D^S et la sensibilité à l'IFN. Certaines de ces substitutions sont uniques au T3D^K, d'autres sont variables selon les isolats. Certaines ont également été décrites comme ayant une importance au niveau de la décapsidation (G198E sur sigma3) (Doyle et al., 2012), de la conversion d'ISVP en ISVP* (A305V sur mu1) (Madren et al., 2012), d'une répression de l'induction d'IFN, de la morphologie des inclusions (S208P sur mu2) (Irvin et al., 2012) et de la résistance à la chymotrypsine (T249I sur sigma1) (Chappell et al., 1998). Nous pensons donc que la notion de type sauvage de réovirus mérite d'être mieux définie afin de mieux comparer directement les différentes études entre elles.

L'utilisation de réovirus en essai clinique pourrait donc poser problème puisqu'il est possible qu'au fil du temps, Reolysin® acquière différentes substitutions pouvant ou

non affecter son efficacité. Cependant, une étude a démontré une certaine homogénéité dans la stabilité de Reolysin® lors de sa production à grande échelle (Chakrabarty et al., 2014).

6.2.5 Précautions à prendre lors de l'utilisation de la génétique inverse

La génétique inverse apporte effectivement beaucoup d'informations et permet plus que jamais une étude précise et contrôlée de réovirus. Par contre, il faut s'assurer que le contexte du T3D^K n'affecte pas les études qui seront entreprises comme c'était le cas avec notre étude sur VeroAV et sur P4L-12.

Aussi, il ne faut pas omettre le fait que toutes les combinaisons de mutations ne pourront pas nécessairement produire un virus capable de se répliquer convenablement. Certaines mutations pourraient être incompatibles entre elles et ne pas engendrer de virus selon le contexte dans lequel elles sont introduites. Il se peut aussi qu'un virus mutant soit viable, mais possède des défauts de croissance qui limitent son utilisation pour des études plus poussées, comme c'était le cas pour certaines combinaisons de mutants du VeroAV.

Mentionnons que lors de la création de virus par génétique inverse, il faut confirmer que la séquence de celui-ci correspond à celle qui est attendue. Il se pourrait que, pour une raison ou une autre, la mutation voulue ait révertée ou qu'il y ait des réversions intra ou extragéniques qui restaureraient le défaut engendré par cette mutation. La génétique inverse est donc une approche aux multiples possibilités, mais qui doit être utilisée avec précautions.

7 Conclusion

Les expériences effectuées ont permis de mieux saisir l'importance relative du tropisme, de la fixation, de la décapsidation, de l'entrée ainsi que de la sensibilité à l'IFN dans la capacité de réovirus à infecter différents types cellulaires. Les approches dites classiques d'adaptation cellulaire et de génétique inverse sont une combinaison intéressante dans l'optique de découvrir et de caractériser de nouveaux variants viraux afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la réplication de réovirus.

Malgré certaines difficultés rencontrées avec les différences au niveau des souches de T3D, la technique de génétique inverse nous a non seulement permis d'étudier certains gènes ou résidus importants lors de la caractérisation de nos mutants de réovirus, mais elle nous a également permis de reconstruire notre virus T3D de référence pour les expériences à venir. Plusieurs questions ont été clarifiées au cours de cette thèse, mais plusieurs en ont découlé également. De nombreuses expériences sont à prévoir afin d'élucider plus directement le potentiel oncolytique des différents virus mutants caractérisés dans cette thèse.

Bien que le réovirus soit peu pathogène chez l'humain adulte, il demeure essentiel de mieux connaître les facteurs pouvant contribuer à augmenter le tropisme et le ciblage des cellules cancéreuses et ainsi diminuer les risques d'effets secondaires. Nos travaux pourraient ainsi contribuer à optimiser l'utilisation de réovirus en tant que virus oncolytique, tout en permettant de mieux prédire la sensibilité de différentes cellules cancéreuses à l'action du virus.

Bibliographie

Adair, R.A., Roulstone, V., Scott, K.J., Morgan, R., Nuovo, G.J., Fuller, M., Beirne, D., West, E.J., Jennings, V.A., Rose, A., et al. (2012). Cell carriage, delivery, and selective replication of an oncolytic virus in tumor in patients. *Sci. Transl. Med.* *4*, 138ra77.

Adams, D.J., Ridinger, D.N., Spendlove, R.S., and Barnett, B.B. (1982). Protamine precipitation of two reovirus particle types from polluted waters. *Appl. Environ. Microbiol.* *44*, 589–596.

Agosto, M.A., Ivanovic, T., and Nibert, M.L. (2006). Mammalian reovirus, a nonfusogenic nonenveloped virus, forms size-selective pores in a model membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 16496–16501.

Agosto, M.A., Middleton, J.K., Freimont, E.C., Yin, J., and Nibert, M.L. (2007). Thermolabilizing pseudoreversions in reovirus outer-capsid protein micro 1 rescue the entry defect conferred by a thermostabilizing mutation. *J. Virol.* *81*, 7400–7409.

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

Alain, T., Kim, M., Johnston, R.N., Urbanski, S., Kossakowska, A.E., Forsyth, P.A., and Lee, P.W.K. (2006). The oncolytic effect in vivo of reovirus on tumour cells that have survived reovirus cell killing in vitro. *Br. J. Cancer* *95*, 1020–1027.

Alain, T., Kim, T.S., Lun, X., Liacini, A., Schiff, L.A., Senger, D.L., and Forsyth, P.A. (2007). Proteolytic disassembly is a critical determinant for reovirus oncolysis. *Mol. Ther.* *15*, 1512–1521.

Alain, T., Lun, X., Martineau, Y., Sean, P., Pulendran, B., Petroulakis, E., Zemp, F.J., Lemay, C.G., Roy, D., Bell, J.C., et al. (2010). Vesicular stomatitis virus oncolysis is potentiated by impairing mTORC1-dependent type I IFN production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 1576–1581.

Aleman, R. (2013). Viruses in cancer treatment. *Clin. Transl. Oncol.* *15*, 182–188.

Amgen Inc. (2014). Amgen submits marketing authorization application for Talimogene Laherparepvec to the european medicines agency. Amgen News releases. Repéré à http://www.amgen.com/media/media_pr_detail.jsp?releaseID=1962767.

Anafu, A.A., Bowen, C.H., Chin, C.R., Brass, A.L., and Holm, G.H. (2013). Interferon-inducible transmembrane protein 3 (IFITM3) restricts reovirus cell entry. *J. Biol. Chem.* *288*, 17261–17271.

Antar, A.A.R., Konopka, J.L., Campbell, J.A., Henry, R.A., Perdigoto, A.L., Carter, B.D., Pozzi, A., Abel, T.W., and Dermody, T.S. (2009). Junctional adhesion molecule-A is required for hematogenous dissemination of reovirus. *Cell Host Microbe* 5, 59–71.

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.

Auer, R., and Bell, J.C. (2012). Oncolytic viruses: smart therapeutics for smart cancers. *Future Oncol.* 8, 1–4.

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.

Baer, G.S., Ebert, D.H., Chung, C.J., Erickson, A.H., and Dermody, T.S. (1999). Mutant cells selected during persistent reovirus infection do not express mature cathepsin L and do not support reovirus disassembly. *J. Virol.* 73, 9532–9543.

Baker, M.L., Schountz, T., and Wang, L.-F. (2013). Antiviral immune responses of bats: a review. *Zoonoses Public Health* 60, 104–116.

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.

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

Bell, J. (2010). Oncolytic viruses: an approved product on the horizon? *Mol. Ther.* 18, 233–234.

Bell, J.C. (2012). The virus that came in from the cold. *Sci. Transl. Med.* 4, 138fs17.

Berger, A.K., and Danthi, P. (2013). Reovirus activates a caspase-independent cell death pathway. *mBio* 4, e00178–00113.

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.

- Berndt, N., Hamilton, A.D., and Sebti, S.M. (2011). Targeting protein prenylation for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* *11*, 775–791.
- Bisaillon, M., and Lemay, G. (1999). Computational sequence analysis of mammalian reovirus proteins. *Virus Genes* *18*, 13–37.
- Bisaillon, M., Sénéchal, 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.
- Bischoff, J.R., and Samuel, C.E. (1989). Mechanism of interferon action. Activation of the human P1/eIF-2 alpha protein kinase by individual reovirus s-class mRNAs: s1 mRNA is a potent activator relative to s4 mRNA. *Virology* *172*, 106–115.
- Bischoff, J.R., Kirn, D.H., Williams, A., Heise, C., Horn, S., Muna, M., Ng, L., Nye, J.A., Sampson-Johannes, A., Fattaey, A., et al. (1996). An Adenovirus Mutant That Replicates Selectively in p53- Deficient Human Tumor Cells. *Science* *274*, 373–376.
- Bodkin, D.K., Nibert, M.L., and Fields, B.N. (1989). Proteolytic digestion of reovirus in the intestinal lumens of neonatal mice. *J. Virol.* *63*, 4676–4681.
- Boehme, K.W., Lai, C.M., and Dermody, T.S. (2013a). Mechanisms of reovirus bloodstream dissemination. *Adv. Virus Res.* *87*, 1–35.
- Boehme, K.W., Hammer, K., Tollefson, W.C., Konopka-Anstadt, J.L., Kobayashi, T., and Dermody, T.S. (2013b). Nonstructural protein $\sigma 1s$ mediates reovirus-induced cell cycle arrest and apoptosis. *J. Virol.* *87*, 12967–12979.
- Bos, J.L. (1989). Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* *49*, 4682–4689.
- Boyce, M., Celma, C.C.P., 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.
- Brady, C.A., and Attardi, L.D. (2010). p53 at a glance. *J. Cell Sci.* *123*, 2527–2532.
- Brass, A.L., Huang, I.-C., Benita, Y., John, S.P., Krishnan, M.N., Feeley, E.M., Ryan, B.J., Weyer, J.L., van der Weyden, L., Fikrig, E., et al. (2009). The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell* *139*, 1243–1254.
- Bringold, F., and Serrano, M. (2000). Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp. Gerontol.* *35*, 317–329.
- Brochu-Lafontaine, V. (2012). Étude de la protéine sigma 1 de réovirus par génétique inverse. (Mémoire de maîtrise, Université de Montréal). Repéré à <https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/handle/1866/8574>.

Brochu-Lafontaine, V., and Lemay, G. (2012). Addition of exogenous polypeptides on the mammalian reovirus outer capsid using reverse genetics. *J. Virol. Methods* 179, 342–350.

Brown, C.J., Lain, S., Verma, C.S., Fersht, A.R., and Lane, D.P. (2009). Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway. *Nat. Rev. Cancer* 9, 862–873.

Bujnicki, J.M., and Rychlewski, L. (2001). Reassignment of specificities of two cap methyltransferase domains in the reovirus lambda 2 protein. *Genome Biol.* 2, 1–6.

Buller, R.M., Chakrabarti, S., Moss, B., and Fredrickson, T. (1988). Cell proliferative response to vaccinia virus is mediated by VGF. *Virology* 164, 182–192.

Campbell, J.A., Schelling, P., Wetzell, J.D., Johnson, E.M., Forrest, J.C., Wilson, G.A.R., Aurrand-Lions, M., Imhof, B.A., Stehle, T., and Dermody, T.S. (2005). Junctional adhesion molecule a serves as a receptor for prototype and field-isolate strains of mammalian reovirus. *J. Virol.* 79, 7967–7978.

Carew, J.S., Espitia, C.M., Zhao, W., Kelly, K.R., Coffey, M., Freeman, J.W., and Nawrocki, S.T. (2013). Reolysin is a novel reovirus-based agent that induces endoplasmic reticular stress-mediated apoptosis in pancreatic cancer. *Cell Death Dis.* 4, e728.

Cawood, R., Chen, H.H., Carroll, F., Bazan-Peregrino, M., van Rooijen, N., and Seymour, L.W. (2009). Use of tissue-specific microRNA to control pathology of wild-type adenovirus without attenuation of its ability to kill cancer cells. *PLoS Pathog.* 5, e1000440.

Cawood, R., Wong, S.-L., Di, Y., Baban, D.F., and Seymour, L.W. (2011). MicroRNA controlled adenovirus mediates anti-cancer efficacy without affecting endogenous microRNA activity. *PloS One* 6, e16152.

Chakrabarty, R., Tran, H., Fortin, Y., Yu, Z., Shen, S.-H., Kolman, J., Onions, D., Voyer, R., Hagerman, A., Serl, S., et al. (2014). Evaluation of homogeneity and genetic stability of REOLYSIN (pelareorep) by complete genome sequencing of reovirus after large scale production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 1763–1770.

Chambers, A.F., Colella, R., Denhardt, D.T., and Wilson, S.M. (1992). Increased expression of cathepsins L and B and decreased activity of their inhibitors in metastatic, ras-transformed NIH 3T3 cells. *Mol. Carcinog.* 5, 238–245.

Chandran, K., and Nibert, M.L. (1998). Protease cleavage of reovirus capsid protein mu1/mu1C is blocked by alkyl sulfate detergents, yielding a new type of infectious subvirion particle. *J. Virol.* 72, 467–475.

Chandran, K., Walker, S.B., Chen, Y., Contreras, C.M., Schiff, L.A., Baker, T.S., and Nibert, M.L. (1999). In vitro recoating of reovirus cores with baculovirus-expressed outer-capsid proteins mu1 and sigma3. *J. Virol.* 73, 3941–3950.

- Chandran, K., Zhang, X., Olson, N.H., Walker, S.B., Chappell, J.D., Dermody, T.S., Baker, T.S., and Nibert, M.L. (2001). Complete in vitro assembly of the reovirus outer capsid produces highly infectious particles suitable for genetic studies of the receptor-binding protein. *J. Virol.* *75*, 5335–5342.
- Chandran, K., Farsetta, D.L., and Nibert, M.L. (2002). Strategy for nonenveloped virus entry: a hydrophobic conformer of the reovirus membrane penetration protein $\mu 1$ mediates membrane disruption. *J. Virol.* *76*, 9920–9933.
- Chandran, K., Parker, J.S.L., Ehrlich, M., Kirchhausen, T., and Nibert, M.L. (2003). The delta region of outer-capsid protein $\mu 1$ undergoes conformational change and release from reovirus particles during cell entry. *J. Virol.* *77*, 13361–13375.
- Chappell, J.D., Gunn, V.L., Wetzel, 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 $\sigma 1$. *J. Virol.* *71*, 1834–1841.
- Chappell, J.D., Barton, E.S., Smith, T.H., Baer, G.S., Duong, D.T., Nibert, M.L., and Dermody, T.S. (1998). Cleavage susceptibility of reovirus attachment protein $\sigma 1$ during proteolytic disassembly of virions is determined by a sequence polymorphism in the $\sigma 1$ neck. *J. Virol.* *72*, 8205–8213.
- Chappell, J.D., Prota, A.E., Dermody, T.S., and Stehle, T. (2002). Crystal structure of reovirus attachment protein $\sigma 1$ reveals evolutionary relationship to adenovirus fiber. *EMBO J.* *21*, 1–11.
- Chawla-Sarkar, M., Lindner, D.J., Liu, Y.-F., Williams, B.R., Sen, G.C., Silverman, R.H., and Borden, E.C. (2003). Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* *8*, 237–249.
- Cheng, L., Zhu, J., Hui, W.H., Zhang, X., Honig, B., Fang, Q., and Zhou, Z.H. (2010). Backbone Model of an Aquareovirus Virion by Cryo-Electron Microscopy and Bioinformatics. *J. Mol. Biol.* *397*, 852–863.
- Cheng, P., Lau ChiShan, Lai, A., Ho, E., Leung, P., Chan, F., Wong, A., and Lim, W. (2009). A novel reovirus isolated from a patient with acute respiratory disease. *45*, 79–80.
- 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.
- Chiocca, E.A. (2008). The host response to cancer virotherapy. *Curr. Opin. Mol. Ther.* *10*, 38–45.
- Chiu, H.-C., Richart, S., Lin, F.-Y., Hsu, W.-L., and Liu, H.-J. (2014). The interplay of reovirus with autophagy. *BioMed Res. Int.* *2014*, 483657.

- Christian, S.L., Collier, T.W., Zu, D., Licursi, M., Hough, C.M., and Hirasawa, K. (2009). Activated Ras/MEK inhibits the antiviral response of alpha interferon by reducing STAT2 levels. *J. Virol.* *83*, 6717–6726.
- Chua, K.B., Cramer, G., Hyatt, A., Yu, M., Tompang, M.R., Rosli, J., McEachern, J., Cramer, S., Kumarasamy, V., Eaton, B.T., et al. (2007). A previously unknown reovirus of bat origin is associated with an acute respiratory disease in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 11424–11429.
- Chua, K.B., Voon, K., Cramer, G., Tan, H.S., Rosli, J., McEachern, J.A., Suluraju, S., Yu, M., and Wang, L.-F. (2008). Identification and characterization of a new orthoreovirus from patients with acute respiratory infections. *PLoS One* *3*, e3803.
- Chua, K.B., Voon, K., Yu, M., Keniscope, C., Abdul Rasid, K., and Wang, L.-F. (2011). Investigation of a potential zoonotic transmission of orthoreovirus associated with acute influenza-like illness in an adult patient. *PLoS One* *6*, e25434.
- Ciechonska, M., and Duncan, R. (2014). Reovirus FAST proteins: virus-encoded cellular fusogens. *Trends Microbiol.* *22*, 715–724.
- Clark, K.M., Wetzel, J.D., Gu, Y., Ebert, D.H., McAbee, S.A., Stoneman, E.K., Baer, G.S., Zhu, Y., Wilson, G.J., Prasad, B.V.V., et al. (2006). Reovirus variants selected for resistance to ammonium chloride have mutations in viral outer-capsid protein sigma3. *J. Virol.* *80*, 671–681.
- Clarke, P., Meintzer, S.M., Gibson, S., Widmann, C., Garrington, T.P., Johnson, G.L., and Tyler, K.L. (2000). Reovirus-induced apoptosis is mediated by TRAIL. *J. Virol.* *74*, 8135–8139.
- Clarke, P., Meintzer, S.M., Spalding, A.C., Johnson, G.L., and Tyler, K.L. (2001). Caspase 8-dependent sensitization of cancer cells to TRAIL-induced apoptosis following reovirus-infection. *Oncogene* *20*, 6910–6919.
- Clemens, M.J. (1997). PKR-a protein kinase regulated by double-stranded RNA. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *29*, 945–949.
- 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.
- Collette, J., Ulku, A.S., Der, C.J., Jones, A., and Erickson, A.H. (2004). Enhanced cathepsin L expression is mediated by different Ras effector pathways in fibroblasts and epithelial cells. *Int. J. Cancer* *112*, 190–199.
- Committee on the Echo Viruses (1955). Enteric Cytopathogenic Human Orphan (ECHO) Viruses. *Science* *122*, 1187–1188.

- Connolly, J.L., Rodgers, S.E., Clarke, P., Ballard, D.W., Kerr, L.D., Tyler, K.L., and Dermody, T.S. (2000). Reovirus-induced apoptosis requires activation of transcription factor NF-kappaB. *J. Virol.* *74*, 2981–2989.
- Connolly, J.L., Barton, E.S., and Dermody, T.S. (2001). Reovirus binding to cell surface sialic acid potentiates virus-induced apoptosis. *J. Virol.* *75*, 4029–4039.
- Coombs, K.M. (2008). Reoviruses: Molecular Biology. In *Encyclopedia of Virology (Third Edition)*, B.W.J. Mahy, Marc, and M.H.V. Van Regenmortel, eds. (Academic Press, Oxford), pp. 390–399. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1016/B978-B012374410-4.00485-4>.
- Danthi, P., Hansberger, M.W., Campbell, J.A., Forrest, J.C., and Dermody, T.S. (2006). JAM-A-independent, antibody-mediated uptake of reovirus into cells leads to apoptosis. *J. Virol.* *80*, 1261–1270.
- Danthi, P., Kobayashi, T., Holm, G.H., Hansberger, M.W., Abel, T.W., and Dermody, T.S. (2008a). Reovirus apoptosis and virulence are regulated by host cell membrane penetration efficiency. *J. Virol.* *82*, 161–172.
- Danthi, P., Coffey, C.M., Parker, J.S.L., Abel, T.W., and Dermody, T.S. (2008b). Independent regulation of reovirus membrane penetration and apoptosis by the mu1 phi domain. *PLoS Pathog.* *4*, e1000248.
- Danthi, P., Guglielmi, K.M., Kirchner, E., Mainou, B., Stehle, T., and Dermody, T.S. (2010). From touchdown to transcription: the reovirus cell entry pathway. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *343*, 91–119.
- Da Pan, Paola, Marcato, Maya Shmulevitz, and Patrick W. Lee (2009). Host Signaling Responses to Reovirus Infection. In *RNA Viruses*, (World Scientific), pp. 627–653. Repéré à http://dx.doi.org/10.1142/9789812833808_0026.
- Dave, R.V., Jebar, A.H.S., Jennings, V.A., Adair, R.A., West, E.J., Errington-Mais, F., Toogood, G.J., and Melcher, A.A. (2014). Viral warfare! Front-line defence and arming the immune system against cancer using oncolytic vaccinia and other viruses. *The Surgeon* *12*, 210–220.
- Dawe, S., and Duncan, R. (2002). The S4 genome segment of baboon reovirus is bicistronic and encodes a novel fusion-associated small transmembrane protein. *J. Virol.* *76*, 2131–2140.
- Day, J.M. (2009). The diversity of the orthoreoviruses: molecular taxonomy and phylogenetic divides. *Infect. Genet. Evol.* *9*, 390–400.
- Demidenko, A.A., Blattman, J.N., Blattman, N.N., Greenberg, P.D., and Nibert, M.L. (2013). Engineering recombinant reoviruses with tandem repeats and a tetravirus 2A-like element for exogenous polypeptide expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, E1867–E1876.

Van Den Wollenberg, D.J.M., Van Den Hengel, S.K., Dautzenberg, I.J.C., Kranenburg, O., and Hoeben, R.C. (2009). Modification of mammalian reoviruses for use as oncolytic agents. *Expert Opin. Biol. Ther.* *9*, 1509–1520.

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

Dermody, T.S., Nibert, M.L., Bassel-Duby, R., and Fields, B.N. (1990). A sigma 1 region important for hemagglutination by serotype 3 reovirus strains. *J. Virol.* *64*, 5173–5176.

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

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).

Deshmukh, D.R., and Pomeroy, B.S. (1969). Avian reoviruses. I. Isolation and serological characterization. *Avian Dis.* *13*, 239–243.

Desmyter, J., Melnick, J.L., and 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.

Diallo, J.-S., Le Boeuf, F., Lai, F., Cox, J., Vaha-Koskela, M., Abdelbary, H., MacTavish, H., Waite, K., Falls, T., Wang, J., et al. (2010). A high-throughput pharmacoviral approach identifies novel oncolytic virus sensitizers. *Mol. Ther.* *18*, 1123–1129.

Dingli, D., Russell, S.J., and Morris, J.C. (2003). In vivo imaging and tumor therapy with the sodium iodide symporter. *J. Cell. Biochem.* *90*, 1079–1086.

Dingli, D., Peng, K.-W., Harvey, M.E., Greipp, P.R., O'Connor, M.K., Cattaneo, R., Morris, J.C., and Russell, S.J. (2004). Image-guided radiovirotherapy for multiple myeloma using a recombinant measles virus expressing the thyroïdal sodium iodide symporter. *Blood* *103*, 1641–1646.

Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Butel, J.S., and Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* *356*, 215–221.

Doyle, J.D., Danthi, P., Kendall, E.A., Ooms, L.S., Wetzel, J.D., and Dermody, T.S. (2012). Molecular determinants of proteolytic disassembly of the reovirus outer capsid. *J. Biol. Chem.* *287*, 8029–8038.

Dryden, K.A., Wang, G., Yeager, M., Nibert, M.L., Coombs, K.M., Furlong, D.B., Fields, B.N., and Baker, T.S. (1993). Early steps in reovirus infection are associated with dramatic changes in supramolecular structure and protein conformation: analysis of

virions and subviral particles by cryoelectron microscopy and image reconstruction. *J. Cell Biol.* *122*, 1023–1041.

Du, L., Lu, Z., Fan, Y., Meng, K., Jiang, Y., Zhu, Y., Wang, S., Gu, W., Zou, X., and Tu, C. (2010). Xi River virus, a new bat reovirus isolated in southern China. *Arch. Virol.* *155*, 1295–1299.

Duncan, R. (1999). Extensive sequence divergence and phylogenetic relationships between the fusogenic and nonfusogenic orthoreoviruses: a species proposal. *Virology* *260*, 316–328.

Duncan, R., and Sullivan, K. (1998). Characterization of two avian reoviruses that exhibit strain-specific quantitative differences in their syncytium-inducing and pathogenic capabilities. *Virology* *250*, 263–272.

Duncan, M.R., Stanish, S.M., and Cox, D.C. (1978). Differential sensitivity of normal and transformed human cells to reovirus infection. *J. Virol.* *28*, 444–449.

Duncan, R., Horne, D., Cashdollar, L.W., Joklik, W.K., and Lee, P.W. (1990). Identification of conserved domains in the cell attachment proteins of the three serotypes of reovirus. *Virology* *174*, 399–409.

Duncan, R., Murphy, F.A., and Mirkovic, R.R. (1995). Characterization of a novel syncytium-inducing baboon reovirus. *Virology* *212*, 752–756.

Duncan, R., Corcoran, J., Shou, J., and Stoltz, D. (2004). Reptilian reovirus: a new fusogenic orthoreovirus species. *Virology* *319*, 131–140.

Ebert, D.H., Wetzel, J.D., Brumbaugh, D.E., Chance, S.R., Stobie, L.E., Baer, G.S., and Dermody, T.S. (2001). Adaptation of reovirus to growth in the presence of protease inhibitor E64 segregates with a mutation in the carboxy terminus of viral outer-capsid protein sigma3. *J. Virol.* *75*, 3197–3206.

Ebert, D.H., Deussing, J., Peters, C., and Dermody, T.S. (2002). Cathepsin L and cathepsin B mediate reovirus disassembly in murine fibroblast cells. *J. Biol. Chem.* *277*, 24609–24617.

Ebert, D.H., Kopecky-Bromberg, S.A., and Dermody, T.S. (2004). Cathepsin B is inhibited in mutant cells selected during persistent reovirus infection. *J. Biol. Chem.* *279*, 3837–3851.

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

Farazi, T.A., Hoell, J.I., Morozov, P., and Tuschl, T. (2013). MicroRNAs in human cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* *774*, 1–20.

Fausnaugh, J., and Shatkin, A.J. (1990). Active site localization in a viral mRNA capping enzyme. *J. Biol. Chem.* *265*, 7669–7672.

Ferguson, M.S., Lemoine, N.R., and Wang, Y. (2012). Systemic delivery of oncolytic viruses: hopes and hurdles. *Adv. Virol.* *2012*, 805629.

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.

Figová, K., Hraběta, J., and Eckschlager, T. (2013). Anticancer efficiency of reovirus in normoxia and hypoxia. *Folia Biol. (Praha)* *59*, 68–75.

Forrest, J.C., Campbell, J.A., Schelling, P., Stehle, T., and Dermody, T.S. (2003). Structure-function analysis of reovirus binding to junctional adhesion molecule 1. Implications for the mechanism of reovirus attachment. *J. Biol. Chem.* *278*, 48434–48444.

Fraser, R.D., Furlong, D.B., Trus, B.L., Nibert, M.L., Fields, B.N., and Steven, A.C. (1990). Molecular structure of the cell-attachment protein of reovirus: correlation of computer-processed electron micrographs with sequence-based predictions. *J. Virol.* *64*, 2990–3000.

Friedman, R.L., Manly, S.P., McMahon, M., Kerr, I.M., and Stark, G.R. (1984). Transcriptional and posttranscriptional regulation of interferon-induced gene expression in human cells. *Cell* *38*, 745–755.

Frierson, J.M., Pruijssers, A.J., Konopka, J.L., Reiter, D.M., Abel, T.W., Stehle, T., and Dermody, T.S. (2012). Utilization of sialylated glycans as coreceptors enhances the neurovirulence of serotype 3 reovirus. *J. Virol.* *86*, 13164–13173.

Furlong, D.B., Nibert, M.L., and Fields, B.N. (1988). Sigma 1 protein of mammalian reoviruses extends from the surfaces of viral particles. *J. Virol.* *62*, 246–256.

Furuichi, Y., Muthukrishnan, S., Tomasz, J., and Shatkin, A.J. (1976). Mechanism of formation of reovirus mRNA 5'-terminal blocked and methylated sequence, m7GpppGmpC. *J. Biol. Chem.* *251*, 5043–5053.

Garber, K. (2006). China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment. *J. Natl. Cancer Inst.* *98*, 298–300.

Gard, G., and Compans, R.W. (1970). Structure and cytopathic effects of Nelson Bay virus. *J. Virol.* *6*, 100–106.

Gard, G.P., and Marshall, I.D. (1973). Nelson Bay virus. A novel reovirus. *Arch. Für Gesamte Virusforsch.* *43*, 34–42.

- Golden, J.W., and Schiff, L.A. (2005). Neutrophil elastase, an acid-independent serine protease, facilitates reovirus uncoating and infection in U937 promonocyte cells. *Viol. J.* 2, 48.
- Golden, J.W., Linke, J., Schmechel, S., Thoenke, 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. (1962). Reactive sites of reovirus type 3 and their interaction with receptor substances. *Virology* 17, 455–461.
- Gomatos, P.J., and Tamm, I. (1963). The secondary structure of reovirus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 49, 707–714.
- Gong, J., and Mita, M.M. (2014). Activated ras signaling pathways and reovirus oncolysis: an update on the mechanism of preferential reovirus replication in cancer cells. *Front. Oncol.* 4, 167.
- Govrin, E., and Levine, A. (1999). Purification of active cysteine proteases by affinity chromatography with attached E-64 inhibitor. *Protein Expr. Purif.* 15, 247–250.
- Gujar, S.A., and Lee, P.W.K. (2014). Oncolytic virus-mediated reversal of impaired tumor antigen presentation. *Front. Oncol.* 4, 77.
- Gujar, S.A., Pan, D.A., Marcato, P., Garant, K.A., and Lee, P.W.K. (2011). Oncolytic virus-initiated protective immunity against prostate cancer. *Mol. Ther.* 19, 797–804.
- Guo, Z.S., Thorne, S.H., and Bartlett, D.L. (2008). Oncolytic virotherapy: molecular targets in tumor-selective replication and carrier cell-mediated delivery of oncolytic viruses. *Biochim. Biophys. Acta* 1785, 217–231.
- Gupta-Saraf, P., and Miller, C.L. (2014). HIF-1 α downregulation and apoptosis in hypoxic prostate tumor cells infected with oncolytic mammalian orthoreovirus. *Oncotarget* 5, 561–574.
- Guse, K., Cerullo, V., and Hemminki, A. (2011). Oncolytic vaccinia virus for the treatment of cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.* 11, 595–608.
- 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.

Hansberger, M.W., Campbell, J.A., Danthi, P., Arrate, P., Pennington, K.N., Marcu, K.B., Ballard, D.W., and Dermody, T.S. (2007). IkappaB kinase subunits alpha and gamma are required for activation of NF-kappaB and induction of apoptosis by mammalian reovirus. *J. Virol.* *81*, 1360–1371.

Harrington, K.J., Melcher, A., Vassaux, G., Pandha, H.S., and Vile, R.G. (2008). Exploiting synergies between radiation and oncolytic viruses. *Curr. Opin. Mol. Ther.* *10*, 362–370.

Harrington, K.J., Vile, R.G., Melcher, A., Chester, J., and 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.

Hashiro, G., Loh, P.C., and Yau, J.T. (1977). The preferential cytotoxicity of reovirus for certain transformed cell lines. *Arch. Virol.* *54*, 307–315.

Hastie, E., and Grdzlishvili, V.Z. (2012). Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. *J. Gen. Virol.* *93*, 2529–2545.

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

Hazelton, P.R., and Coombs, K.M. (1999). The reovirus mutant tsA279 L2 gene is associated with generation of a spikeless core particle: implications for capsid assembly. *J. Virol.* *73*, 2298–2308.

Van den Hengel, S.K., Dautzenberg, I.J.C., van den Wollenberg, D.J.M., Smitt, P.A.E.S., and Hoeben, R.C. (2012). Genetic modification in mammalian orthoreoviruses. In *Reverse Genetics of RNA Viruses*, A. Bridgen, ed. (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 289–317. Repéré à <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118405338.ch10/summary>.

Van den Hengel, S.K., Balvers, R.K., Dautzenberg, I.J.C., van den Wollenberg, D.J.M., Kloezeman, J.J., Lamfers, M.L., Sillivis-Smit, P. a. E., and Hoeben, R.C. (2013). Heterogeneous reovirus susceptibility in human glioblastoma stem-like cell cultures. *Cancer Gene Ther.* *20*, 507–513.

Holm, G.H., Zurney, J., Tumilasci, V., Leveille, S., Danthi, P., Hiscott, J., Sherry, B., and Dermody, T.S. (2007). Retinoic acid-inducible gene-I and interferon-beta promoter stimulator-1 augment proapoptotic responses following mammalian reovirus infection via interferon regulatory factor-3. *J. Biol. Chem.* *282*, 21953–21961.

Van Houdt, W.J., Smakman, N., van den Wollenberg, D.J.M., Emmink, B.L., Veenendaal, L.M., van Diest, P.J., Hoeben, R.C., Borel Rinkes, I.H.M., and Kranenburg, O. (2008). Transient infection of freshly isolated human colorectal tumor cells by reovirus T3D intermediate subviral particles. *Cancer Gene Ther.* *15*, 284–292.

- Hrdy, D.B., Rubin, D.H., and Fields, B.N. (1982). Molecular basis of reovirus neurovirulence: role of the M2 gene in avirulence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *79*, 1298–1302.
- Huang, I.-C., Bailey, C.C., Weyer, J.L., Radoshitzky, S.R., Becker, M.M., Chiang, J.J., Brass, A.L., Ahmed, A.A., Chi, X., Dong, L., et al. (2011). Distinct patterns of IFITM-mediated restriction of filoviruses, SARS coronavirus, and influenza A virus. *PLoS Pathog.* *7*, e1001258.
- Huebner, R.J., Rowe, W.P., Schatten, W.E., Smith, R.R., and Thomas, L.B. (1956). Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix. *Cancer* *9*, 1211–1218.
- Huisman, H., and Joklik, W.K. (1976). Reovirus-coded polypeptides in infected cells: isolation of two native monomeric polypeptides with affinity for single-stranded and double-stranded RNA, respectively. *Virology* *70*, 411–424.
- Ikegami, N., and Gomatos, P.J. (1968). Temperature-sensitive conditional-lethal mutants of reovirus 3. I. Isolation and characterization. *Virology* *36*, 447–458.
- Ilett, E., Kottke, T., Donnelly, O., Thompson, J., Willmon, C., Diaz, R., Zaidi, S., Coffey, M., Selby, P., Harrington, K., et al. (2014). Cytokine conditioning enhances systemic delivery and therapy of an oncolytic virus. *Mol. Ther.* *22*, 1851–1863.
- Ilett, E.J., Prestwich, R.J., Kottke, T., Errington, F., Thompson, J.M., Harrington, K.J., Pandha, H.S., Coffey, M., Selby, P.J., Vile, R.G., et al. (2009). Dendritic cells and T cells deliver oncolytic reovirus for tumour killing despite pre-existing anti-viral immunity. *Gene Ther.* *16*, 689–699.
- Ilett, E.J., Bárcena, M., Errington-Mais, F., Griffin, S., Harrington, K.J., Pandha, H.S., Coffey, M., Selby, P.J., Limpens, R.W.A.L., Mommaas, M., et al. (2011). Internalization of oncolytic reovirus by human dendritic cell carriers protects the virus from neutralization. *Clin. Cancer Res.* *17*, 2767–2776.
- Imani, F., and Jacobs, B.L. (1988). Inhibitory activity for the interferon-induced protein kinase is associated with the reovirus serotype 1 sigma 3 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *85*, 7887–7891.
- 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 μ 2 determines repression of interferon signaling and modulates myocarditis. *J. Virol.* *86*, 2302–2311.
- Ivanovic, T., Agosto, M.A., Chandran, K., and Nibert, M.L. (2007). A role for molecular chaperone Hsc70 in reovirus outer capsid disassembly. *J. Biol. Chem.* *282*, 12210–12219.
- Ivanovic, T., Agosto, M.A., Zhang, L., Chandran, K., Harrison, S.C., and Nibert, M.L. (2008). Peptides released from reovirus outer capsid form membrane pores that recruit virus particles. *EMBO J.* *27*, 1289–1298.

Jabre, R., Sandekian, V., and 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.

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., and Samuel, C.E. (1985). Biosynthesis of reovirus-specified polypeptides: the reovirus s1 mRNA encodes two primary translation products. *Virology* *143*, 63–74.

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.

Janelle, V., Poliquin, L., and Lamarre, A. (2013). Le virus de la stomatite vésiculaire dans la lutte contre le cancer. *Médecine/sciences* *29*, 175–182.

Jané-Valbuena, J., Nibert, M.L., Spencer, S.M., Walker, S.B., Baker, T.S., Chen, Y., Centonze, V.E., and Schiff, L.A. (1999). Reovirus virion-like particles obtained by recoating infectious subvirion particles with baculovirus-expressed sigma3 protein: an approach for analyzing sigma3 functions during virus entry. *J. Virol.* *73*, 2963–2973.

Jayasuriya, A.K., Nibert, M.L., and Fields, B.N. (1988). Complete nucleotide sequence of the M2 gene segment of reovirus type 3 dearing and analysis of its protein product mu 1. *Virology* *163*, 591–602.

Jiang, D., Weidner, J.M., Qing, M., Pan, X.-B., Guo, H., Xu, C., Zhang, X., Birk, A., Chang, J., Shi, P.-Y., et al. (2010). Identification of five interferon-induced cellular proteins that inhibit west nile virus and dengue virus infections. *J. Virol.* *84*, 8332–8341.

Johansson, P.J., Sveger, T., Ahlfors, K., Ekstrand, J., and Svensson, L. (1996). Reovirus type 1 associated with meningitis. *Scand. J. Infect. Dis.* *28*, 117–120.

Kahn, E. (2004). Biliary atresia revisited. *Pediatr. Dev. Pathol.* *7*, 109–124.

Kauffman, R.S., Ahmed, R., and Fields, B.N. (1983). Selection of a mutant S1 gene during reovirus persistent infection of L cells: role in maintenance of the persistent state. *Virology* *131*, 79–87.

Kelly, K., Nawrocki, S., Mita, A., Coffey, M., Giles, F.J., and Mita, M. (2009). Reovirus-based therapy for cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.* *9*, 817–830.

Kelly, K.R., Espitia, C.M., Mahalingam, D., Oyajobi, B.O., Coffey, M., Giles, F.J., Carew, J.S., and Nawrocki, S.T. (2012). Reovirus therapy stimulates endoplasmic reticular stress, NOXA induction, and augments bortezomib-mediated apoptosis in multiple myeloma. *Oncogene* *31*, 3023–3038.

- Kibenge, M.J.T., Iwamoto, T., Wang, Y., Morton, A., Godoy, M.G., and Kibenge, F.S.B. (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. *Viol. J.* *10*, 230.
- Kim, J.-W., Lyi, S.M., Parrish, C.R., and Parker, J.S.L. (2011a). A proapoptotic peptide derived from reovirus outer capsid protein $\mu 1$ has membrane-destabilizing activity. *J. Virol.* *85*, 1507–1516.
- Kim, M., Egan, C., Alain, T., Urbanski, S.J., Lee, P.W., Forsyth, P.A., and Johnston, R.N. (2007). Acquired resistance to reoviral oncolysis in Ras-transformed fibrosarcoma cells. *Oncogene* *26*, 4124–4134.
- Kim, M., Williamson, C.T., Prudhomme, J., Bebb, D.G., Riabowol, K., Lee, P.W.K., Lees-Miller, S.P., Mori, Y., Rahman, M.M., McFadden, G., et al. (2010). The viral tropism of two distinct oncolytic viruses, reovirus and myxoma virus, is modulated by cellular tumor suppressor gene status. *Oncogene* *29*, 3990–3996.
- Kim, M., Garant, K.A., zur Nieden, N.I., Alain, T., Loken, S.D., Urbanski, S.J., Forsyth, P.A., Rancourt, D.E., Lee, P.W.K., and Johnston, R.N. (2011b). Attenuated reovirus displays oncolysis with reduced host toxicity. *Br. J. Cancer* *104*, 290–299.
- King, A., Adams, M.J., Carstens, E.B., and Lefkowitz, E.J. (2012). Family-Reoviridae. In *Virus Taxonomy*, 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, (Elsevier), pp. 541–637. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123846846000513>.
- Kirchner, E., Guglielmi, K.M., Strauss, H.M., Dermody, T.S., and Stehle, T. (2008). Structure of reovirus sigma1 in complex with its receptor junctional adhesion molecule-A. *PLoS Pathog.* *4*, e1000235.
- 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- κ B-dependent expression of Noxa. *J. Virol.* *86*, 1650–1660.
- Kobayashi, T., Antar, A.A.R., 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.
- Kohl, C., Lesnik, R., Brinkmann, A., Ebinger, A., Radonić, A., Nitsche, A., Mühldorfer, K., Wibbelt, G., and Kurth, A. (2012). Isolation and characterization of three mammalian orthoreoviruses from European bats. *PloS One* *7*, e43106.

Kominsky, D.J., Bickel, R.J., and Tyler, K.L. (2002a). Reovirus-induced apoptosis requires mitochondrial release of Smac/DIABLO and involves reduction of cellular inhibitor of apoptosis protein levels. *J. Virol.* *76*, 11414–11424.

Kominsky, D.J., Bickel, R.J., and Tyler, K.L. (2002b). Reovirus-induced apoptosis requires both death receptor- and mitochondrial-mediated caspase-dependent pathways of cell death. *Cell Death Differ.* *9*, 926–933.

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.

Kottke, T., Hall, G., Pulido, J., Diaz, R.M., Thompson, J., Chong, H., Selby, P., Coffey, M., Pandha, H., Chester, J., et al. (2010). Antiangiogenic cancer therapy combined with oncolytic virotherapy leads to regression of established tumors in mice. *J. Clin. Invest.* *120*, 1551–1560.

Kufe, D.W. (2009). Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 874–885.

Kumar, S., Gao, L., Yeagy, B., and Reid, T. (2008). Virus combinations and chemotherapy for the treatment of human cancers. *Curr. Opin. Mol. Ther.* *10*, 371–379.

Laniosz, V., Holthusen, K.A., and Meneses, P.I. (2008). Bovine papillomavirus type 1: from clathrin to caveolin. *J. Virol.* *82*, 6288–6298.

Leber, M.F., Bossow, S., Leonard, V.H.J., Zaoui, K., Grossardt, C., Frenzke, M., Miest, T., Sawall, S., Cattaneo, R., von Kalle, C., et al. (2011). MicroRNA-sensitive oncolytic measles viruses for cancer-specific vector tropism. *Mol. Ther.* *19*, 1097–1106.

Lee, P., Clements, D., Helson, E., and Gujar, S. (2014). Reovirus in cancer therapy: an evidence-based review. *Oncolytic Virotherapy* *69*.

Lee, S., Gang, J., Jeon, S.B., Choo, S.H., Lee, B., Kim, Y.-G., Lee, Y.S., Jung, J., Song, S.Y., and Koh, S.S. (2007). Molecular cloning and functional analysis of a novel oncogene, cancer-upregulated gene 2 (CUG2). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *360*, 633–639.

Lemay, G. (2009). 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. (2011). La génétique inverse dans l'étude des réovirus : progrès, obstacles et développements futurs. *Virologie 15*, 53–62.
- Lemay, G., Tumilasci, V., and Hiscott, J. (2007). Uncoating reo: uncovering the steps critical for oncolysis. *Mol. Ther. 15*, 1406–1407.
- Levine, A.J., and Oren, M. (2009). The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat. Rev. Cancer 9*, 749–758.
- Lewin, A.R., Reid, L.E., McMahon, M., Stark, G.R., and Kerr, I.M. (1991). Molecular analysis of a human interferon-inducible gene family. *Eur. J. Biochem. FEBS 199*, 417–423.
- Lichty, B., Pol, and Resseguier (2011). Oncolytic viruses: a step into cancer immunotherapy. *Virus Adapt. Treat. 2012*, 1–21.
- 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.
- Liu, T.-C., Galanis, E., and Kirn, D. (2007). Clinical trial results with oncolytic virotherapy: a century of promise, a decade of progress. *Nat. Clin. Pract. Oncol. 4*, 101–117.
- Lloyd, R.M., and Shatkin, A.J. (1992). Translational stimulation by reovirus polypeptide sigma 3: substitution for VAI RNA and inhibition of phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2. *J. Virol. 66*, 6878–6884.
- Loken, S.D., Norman, K., Hirasawa, K., Nodwell, M., Lester, W.M., and Demetrick, D.J. (2004). Morbidity in immunosuppressed (SCID/NOD) mice treated with reovirus (dearing 3) as an anti-cancer biotherapeutic. *Cancer Biol. Ther. 3*, 734–738.
- Lun, X., Senger, D.L., Alain, T., Oprea, A., Parato, K., Stojdl, D., Lichty, B., Power, A., Johnston, R.N., Hamilton, M., et al. (2006). Effects of intravenously administered recombinant vesicular stomatitis virus (VSV(deltaM51)) on multifocal and invasive gliomas. *J. Natl. Cancer Inst. 98*, 1546–1557.
- Luongo, C.L. (2002). Mutational analysis of a mammalian reovirus mRNA capping enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun. 291*, 932–938.
- 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., and Lemay, G. (1994). Mutations in a CCHC zinc-binding motif of the reovirus sigma 3 protein decrease its intracellular stability. *J. Virol. 68*, 5287–5290.

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.

Madren, J.A., Sarkar, P., and Danthi, P. (2012). Cell entry-associated conformational changes in reovirus particles are controlled by host protease activity. *J. Virol.* *86*, 3466–3473.

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.

Maginnis, M.S., Mainou, B.A., Derdowski, A., Johnson, E.M., Zent, R., and Dermody, T.S. (2008). NPXY motifs in the beta1 integrin cytoplasmic tail are required for functional reovirus entry. *J. Virol.* *82*, 3181–3191.

Mainou, B.A., and Dermody, T.S. (2012). Transport to late endosomes is required for efficient reovirus infection. *J. Virol.* *86*, 8346–8358.

Mainou, B.A., Zamora, P.F., Ashbrook, A.W., Dorset, D.C., Kim, K.S., and Dermody, T.S. (2013). Reovirus cell entry requires functional microtubules. *mBio* *4*, 1–10.

Maitra, R., Ghalib, M.H., and Goel, S. (2012). Reovirus: a targeted therapeutic--progress and potential. *Mol. Cancer Res.* *10*, 1514–1525.

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.

Marcato, P., Dean, C.A., Giacomantonio, C.A., and Lee, P.W.K. (2009). Oncolytic reovirus effectively targets breast cancer stem cells. *Mol. Ther.* *17*, 972–979.

Matsumoto, K., Yamamoto, D., Ohishi, H., Tomoo, K., Ishida, T., Inoue, M., Sadatome, T., Kitamura, K., and Mizuno, H. (1989). Mode of binding of E-64-c, a potent thiol protease inhibitor, to papain as determined by X-ray crystal analysis of the complex. *FEBS Lett.* *245*, 177–180.

McPhillips, T.H., and Ramig, R.F. (1984). Extragenic suppression of temperature-sensitive phenotype in reovirus: mapping suppressor mutations. *Virology* *135*, 428–439.

Meng, S., Jiang, K., Zhang, X., Zhang, M., Zhou, Z., Hu, M., Yang, R., Sun, C., and Wu, Y. (2012). Avian reovirus triggers autophagy in primary chicken fibroblast cells and Vero cells to promote virus production. *Arch. Virol.* *157*, 661–668.

Middleton, J.K., Severson, T.F., Chandran, K., Gillian, A.L., Yin, J., and Nibert, M.L. (2002). Thermostability of reovirus disassembly intermediates (ISVPs) correlates with genetic, biochemical, and thermodynamic properties of major surface protein mu1. *J. Virol.* *76*, 1051–1061.

- Middleton, J.K., Agosto, M.A., Severson, T.F., Yin, J., and Nibert, M.L. (2007). Thermostabilizing mutations in reovirus outer-capsid protein $\mu 1$ selected by heat inactivation of infectious subviral particles. *Virology* 361, 412–425.
- 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.
- Miller, C.L., Arnold, M.M., Broering, T.J., Hastings, C.E., and Nibert, M.L. (2010). Localization of mammalian orthoreovirus proteins to cytoplasmic factory-like structures via nonoverlapping regions of μ NS. *J. Virol.* 84, 867–882.
- Milligan, J.F., Groebe, D.R., Witherell, G.W., and Uhlenbeck, O.C. (1987). Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Res.* 15, 8783–8798.
- Monteiro, A.C., Sumagin, R., Rankin, C.R., Leoni, G., Mina, M.J., Reiter, D.M., Stehle, T., Dermody, T.S., Schaefer, S.A., Hall, R.A., et al. (2013). JAM-A associates with ZO-2, afadin, and PDZ-GEF1 to activate Rap2c and regulate epithelial barrier function. *Mol. Biol. Cell* 24, 2849–2860.
- Morrison, L.A., Sidman, R.L., and Fields, B.N. (1991). Direct spread of reovirus from the intestinal lumen to the central nervous system through vagal autonomic nerve fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 3852–3856.
- Mosca, J.D., and Pitha, P.M. (1986). Transcriptional and posttranscriptional regulation of exogenous human beta interferon gene in simian cells defective in interferon synthesis. *Mol. Cell. Biol.* 6, 2279–2283.
- Mullen, J.T., and Tanabe, K.K. (2002). Viral oncolysis. *The Oncologist* 7, 106–119.
- Muñoz-Fontela, C., Macip, S., Martínez-Sobrido, L., Brown, L., Ashour, J., García-Sastre, A., Lee, S.W., and Aaronson, S.A. (2008). Transcriptional role of p53 in interferon-mediated antiviral immunity. *J. Exp. Med.* 205, 1929–1938.
- 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.
- Nason, E.L., Samal, S.K., and Venkataram Prasad, B.V. (2000). Trypsin-induced structural transformation in aquareovirus. *J. Virol.* 74, 6546–6555.
- Nibert, M.L., Dermody, T.S., and Fields, B.N. (1990). Structure of the reovirus cell-attachment protein: a model for the domain organization of sigma 1. *J. Virol.* 64, 2976–2989.

Nibert, M.L., Schiff, L.A., and Fields, B.N. (1996). Reoviruses and their replication. In TMFundamental Virology, B.N. Fields, D.M. Knipe, and P.M. Howley, eds. (New York: Lippincott-Raven Press), pp. 691–730.

Norman, K.L., Hirasawa, K., Yang, A.-D., Shields, M.A., and Lee, P.W.K. (2004). Reovirus oncolysis: the Ras/RalGEF/p38 pathway dictates host cell permissiveness to reovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 11099–11104.

Nygaard, R.M., Golden, J.W., and Schiff, L.A. (2012). Impact of host proteases on reovirus infection in the respiratory tract. *J. Virol.* *86*, 1238–1243.

Oberhaus, S.M., Smith, R.L., Clayton, G.H., Dermody, T.S., and Tyler, K.L. (1997). Reovirus infection and tissue injury in the mouse central nervous system are associated with apoptosis. *J. Virol.* *71*, 2100–2106.

Odegard, A.L., Chandran, K., Zhang, X., Parker, J.S.L., Baker, T.S., and Nibert, M.L. (2004). Putative autocleavage of outer capsid protein micro1, allowing release of myristoylated peptide micro1N during particle uncoating, is critical for cell entry by reovirus. *J. Virol.* *78*, 8732–8745.

Olland, A.M., Jané-Valbuena, J., Schiff, L.A., Nibert, M.L., and Harrison, S.C. (2001). Structure of the reovirus outer capsid and dsRNA-binding protein sigma3 at 1.8 Å resolution. *EMBO J.* *20*, 979–989.

Oncolytics Biotech Inc. (2014). A Novel Approach to Cancer Therapeutics. Repéré à <http://www.oncolyticsbiotech.com/>.

Oncolytics Biotech Inc (2014). Intravenous Administration of REOLYSIN® in Combination with Paclitaxel and Carboplatin for Patients with Platinum-Refractory Head and Neck Cancer. Repéré à <http://www.oncolyticsbiotech.com/English/clinical-trials/clinical-trials-news/clinical-trials-details/2013/REO-018/>.

Ong, H.T., Hasegawa, K., Dietz, A.B., Russell, S.J., and Peng, K.-W. (2007). Evaluation of T cells as carriers for systemic measles virotherapy in the presence of antiviral antibodies. *Gene Ther.* *14*, 324–333.

O’Shea, T.J., Cryan, P.M., Cunningham, A.A., Fooks, A.R., Hayman, D.T.S., Luis, A.D., Peel, A.J., Plowright, R.K., and Wood, J.L.N. (2014). Bat flight and zoonotic viruses. *Emerg. Infect. Dis.* *20*, 741–745.

Ouattara, L.A., Barin, F., Barthez, M.A., Bonnaud, B., Roingeard, P., Goudeau, A., Castelnau, P., Vernet, G., Paranhos-Baccalà, G., and Komurian-Pradel, F. (2011). Novel human reovirus isolated from children with acute necrotizing encephalopathy. *Emerg. Infect. Dis.* *17*, 1436–1444.

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.

Pan, D., Pan, L.-Z., Hill, R., Marcato, P., Shmulevitz, M., Vassilev, L.T., and Lee, P.W.K. (2011). Stabilisation of p53 enhances reovirus-induced apoptosis and virus spread through p53-dependent NF- κ B activation. *Br. J. Cancer* 105, 1012–1022.

Pan, D., Marcato, P., Ahn, D.-G., Gujar, S., Pan, L.-Z., Shmulevitz, M., and Lee, P.W.K. (2013). Activation of p53 by chemotherapeutic agents enhances reovirus oncolysis. *PLoS One* 8, e54006.

Park, B.-H., Hwang, T., Liu, T.-C., Sze, D.Y., Kim, J.-S., Kwon, H.-C., Oh, S.Y., Han, S.-Y., Yoon, J.-H., Hong, S.-H., et al. (2008). Use of a targeted oncolytic poxvirus, JX-594, in patients with refractory primary or metastatic liver cancer: a phase I trial. *Lancet Oncol.* 9, 533–542.

Park, E.-H., Park, E.H., Cho, I.-R., Srisuttee, R., Min, H.-J., Oh, M.-J., Jeong, Y.-J., Jhun, B.H., Johnston, R.N., Lee, S., et al. (2010). CUG2, a novel oncogene confers reoviral replication through Ras and p38 signaling pathway. *Cancer Gene Ther.* 17, 307–314.

Parker, J.S.L. (2008). Reovirus research. James A. Baker Institute for Animal Health, College of Veterinary Medicine, Cornell University. Repéré à https://courses.cit.cornell.edu/parker_lab/Reovirus.htm.

Paul, R.W., and Lee, P.W. (1987). Glycophorin is the reovirus receptor on human erythrocytes. *Virology* 159, 94–101.

Pett, D.M., Vanaman, T.C., and Joklik, W.K. (1973). Studies on the amino and carboxyl terminal amino acid sequences of reovirus capsid polypeptides. *Virology* 52, 174–186.

Prestwich, R.J., Ilett, E.J., Errington, F., Diaz, R.M., Steele, L.P., Kottke, T., Thompson, J., Galivo, F., Harrington, K.J., Pandha, H.S., et al. (2009). Immune-mediated antitumor activity of reovirus is required for therapy and is independent of direct viral oncolysis and replication. *Clin. Cancer Res.* 15, 4374–4381.

Pritchard, L.I., Chua, K.B., Cummins, D., Hyatt, A., Crameri, G., Eaton, B.T., and Wang, L.-F. (2006). Pulau virus; a new member of the Nelson Bay orthoreovirus species isolated from fruit bats in Malaysia. *Arch. Virol.* 151, 229–239.

Prota, A.E., Campbell, J.A., Schelling, P., Forrest, J.C., Watson, M.J., Peters, T.R., Aurrand-Lions, M., Imhof, B.A., Dermody, T.S., and Stehle, T. (2003). Crystal structure of human junctional adhesion molecule 1: implications for reovirus binding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 5366–5371.

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

Qiao, J., Wang, H., Kottke, T., Diaz, R.M., Willmon, C., Hudacek, A., Thompson, J., Parato, K., Bell, J., Naik, J., et al. (2008). Loading of oncolytic vesicular stomatitis virus onto antigen-specific T cells enhances the efficacy of adoptive T-cell therapy of tumors. *Gene Ther.* *15*, 604–616.

Querbes, W., O'Hara, B.A., Williams, G., and Atwood, W.J. (2006). Invasion of host cells by JC virus identifies a novel role for caveolae in endosomal sorting of noncaveolar ligands. *J. Virol.* *80*, 9402–9413.

Ramig, R.F., and Fields, B.N. (1977). Method for rapidly screening revertants of reovirus temperature-sensitive mutants for extragenic suppression. *Virology* *81*, 170–173.

Ramig, R.F., and Fields, B.N. (1979). Revertants of temperature-sensitive mutants of reovirus: evidence for frequent extragenic suppression. *Virology* *92*, 155–167.

Ramos-Alvarez, M., and Sabin, A.B. (1954). Characteristics of poliomyelitis and other enteric viruses recovered in tissue culture from healthy American children. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* *87*, 655–661.

Reiss, K., Stencel, J.E., Liu, Y., Blaum, B.S., Reiter, D.M., Feizi, T., Dermody, T.S., and Stehle, T. (2012). The GM2 glycan serves as a functional coreceptor for serotype 1 reovirus. *PLoS Pathog.* *8*, e1003078.

Reiter, D.M., Frierson, J.M., Halvorson, E.E., Kobayashi, T., Dermody, T.S., and Stehle, T. (2011). Crystal structure of reovirus attachment protein $\sigma 1$ in complex with sialylated oligosaccharides. *PLoS Pathog.* *7*, e1002166.

Ridinger, D.N., Spendlove, R.S., Barnett, B.B., George, D.B., and Roth, J.C. (1982). Evaluation of cell lines and immunofluorescence and plaque assay procedures for quantifying reoviruses in sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* *43*, 740–746.

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

Roner, M.R., and Joklik, W.K. (2001). Reovirus reverse genetics: Incorporation of the CAT gene into the reovirus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 8036–8041.

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

Roner, M.R., Nepliouev, I., Sherry, B., and Joklik, W.K. (1997). Construction and characterization of a reovirus double temperature-sensitive mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *94*, 6826–6830.

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

- Rosen, L. (1965). Subclassification of Picornaviruses. *Bacteriol. Rev.* 29, 173–184.
- Rosen, L., Hovis, J.F., Mastrota, F.M., Bell, J.A., and Huebner, R.J. (1960). Observations on a newly recognized virus (Abney) of the reovirus family. *Am. J. Hyg.* 71, 258–265.
- Rosen, L., Evans, H.E., and Spickard, A. (1963). Reovirus infections in human volunteers. *Am. J. Hyg.* 77, 29–37.
- Rouault, E., and Lemay, G. (2003). Incorporation of epitope-tagged viral sigma3 proteins to reovirus virions. *Can. J. Microbiol.* 49, 407–417.
- 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.
- Salsman, J., Top, D., Boutilier, J., and Duncan, R. (2005). Extensive syncytium formation mediated by the reovirus FAST proteins triggers apoptosis-induced membrane instability. *J. Virol.* 79, 8090–8100.
- Sandekian, V., and Lemay, G. (2014). Des virus devenus des super-héros contre le cancer? *Mag. Facteur Santé* 28 février, Repéré à [http://magfacteursante.com/des – virus – devenus – des – super – heros – contre – le – cancer/](http://magfacteursante.com/des-virus-devenus-des-super-heros-contre-le-cancer/).
- Sandekian, V., and Lemay, G. (2015). 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., 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.
- Sarkar, P., and Danthi, P. (2010). Determinants of strain-specific differences in efficiency of reovirus entry. *J. Virol.* 84, 12723–12732.
- Sarkar, P., and Danthi, P. (2013). The $\mu 1$ 72-96 loop controls conformational transitions during reovirus cell entry. *J. Virol.* 87, 13532–13542.
- Schelling, P., Guglielmi, K.M., Kirchner, E., Paetzold, B., Dermody, T.S., and Stehle, T. (2007). The reovirus sigma1 aspartic acid sandwich: a trimerization motif poised for conformational change. *J. Biol. Chem.* 282, 11582–11589.

Schiff, L.A. (1998). Reovirus capsid proteins sigma 3 and mu 1: interactions that influence viral entry, assembly, and translational control. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 233, 167–183.

Schiff, L.A., Nibert, M.L., Co, M.S., Brown, E.G., and Fields, B.N. (1988). Distinct binding sites for zinc and double-stranded RNA in the reovirus outer capsid protein sigma 3. *Mol. Cell. Biol.* 8, 273–283.

Schmechel, S., Chute, M., Skinner, P., Anderson, R., and Schiff, L. (1997). Preferential translation of reovirus mRNA by a sigma3-dependent mechanism. *Virology* 232, 62–73.

Senzer, N.N., Kaufman, H.L., Amatruda, T., Nemunaitis, M., Reid, T., Daniels, G., Gonzalez, R., Glaspy, J., Whitman, E., Harrington, K., et al. (2009). Phase II clinical trial of a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encoding, second-generation oncolytic herpesvirus in patients with unresectable metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 27, 5763–5771.

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

Sherr, C.J., and Weber, J.D. (2000). The ARF/p53 pathway. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 94–99.

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., and Duncan, R. (2000). A new class of fusion-associated small transmembrane (FAST) proteins encoded by the non-enveloped fusogenic reoviruses. *EMBO J.* 19, 902–912.

Shmulevitz, M., Marcato, P., and Lee, P.W.K. (2005). Unshackling the links between reovirus oncolysis, Ras signaling, translational control and cancer. *Oncogene* 24, 7720–7728.

Shmulevitz, M., Pan, L.-Z., Garant, K., Pan, D., and 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.

Shmulevitz, M., Gujar, S.A., Ahn, D.-G., Mohamed, A., and Lee, P.W.K. (2012). Reovirus variants with mutations in genome segments S1 and L2 exhibit enhanced virion infectivity and superior oncolysis. *J. Virol.* 86, 7403–7413.

- Sigal, A., and Rotter, V. (2000). Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res.* *60*, 6788–6793.
- De Silva, N., Atkins, H., Kirn, D.H., Bell, J.C., and Breitbach, C.J. (2010). Double trouble for tumours: exploiting the tumour microenvironment to enhance anticancer effect of oncolytic viruses. *Cytokine Growth Factor Rev.* *21*, 135–141.
- 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.G., 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.
- Smith, R.E., Zweerink, H.J., and Joklik, W.K. (1969). Polypeptide components of virions, top component and cores of reovirus type 3. *Virology* *39*, 791–810.
- Société Canadienne du cancer (2014). Statistiques canadiennes sur le cancer. Repéré à <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-101/canadian-cancer-statistics-publication/?region=qc>.
- Speidel, D. (2015). The role of DNA damage responses in p53 biology. *Arch. Toxicol.* *89*, 501–517.
- Stanford, M.M., Bell, J.C., and Vähä-Koskela, M.J.V. (2010). Novel oncolytic viruses: Riding high on the next wave? *Cytokine Growth Factor Rev.* *21*, 177–183.
- Stehle, T., and Dermody, T.S. (2003). Structural evidence for common functions and ancestry of the reovirus and adenovirus attachment proteins. *Rev. Med. Virol.* *13*, 123–132.
- Stencel-Baerenwald, J.E., Reiss, K., Reiter, D.M., Stehle, T., and Dermody, T.S. (2014). The sweet spot: defining virus-sialic acid interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* *12*, 739–749.
- 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.
- Stojdl, D.F., Lichty, B.D., tenOever, B.R., Paterson, J.M., Power, A.T., Knowles, S., Marius, R., Reynard, J., Poliquin, L., Atkins, H., et al. (2003). VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell* *4*, 263–275.
- Strong, J.E., and Lee, P.W. (1996). The v-erbB oncogene confers enhanced cellular susceptibility to reovirus infection. *J. Virol.* *70*, 612–616.

Strong, J.E., Tang, D., and Lee, P.W. (1993). Evidence that the epidermal growth factor receptor on host cells confers reovirus infection efficiency. *Virology* *197*, 405–411.

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.

Sturzenbecker, L.J., Nibert, M., Furlong, D., and Fields, B.N. (1987). Intracellular digestion of reovirus particles requires a low pH and is an essential step in the viral infectious cycle. *J. Virol.* *61*, 2351–2361.

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

Takaoka, A., Hayakawa, S., Yanai, H., Stoiber, D., Negishi, H., Kikuchi, H., Sasaki, S., Imai, K., Shibue, T., Honda, K., et al. (2003). Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature* *424*, 516–523.

Tedcastle, A., Cawood, R., Di, Y., Fisher, K.D., and Seymour, L.W. (2012). Virotherapy-cancer targeted pharmacology. *Drug Discov. Today* *17*, 215–220.

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.

The Pharma Letter (2014). Disappointing results with Amgen's talimogene laherparepvec in metastatic melanoma. Repéré à <http://www.thepharmaletter.com/article/disappointing-results-with-amgen-s-talimogene-laherparepvec-in-metastatic-melanoma>.

Thirukkumaran, C.M., Shi, Z.Q., Luider, J., Kopciuk, K., Gao, H., Bahlis, N., Neri, P., Pho, M., Stewart, D., Mansoor, A., et al. (2013). Reovirus modulates autophagy during oncolysis of multiple myeloma. *Autophagy* *9*, 413–414.

Twigger, K., Roulstone, V., Kyula, J., Karapanagiotou, E.M., Syrigos, K.N., Morgan, R., White, C., Bhide, S., Nuovo, G., Coffey, M., et al. (2012). Reovirus exerts potent oncolytic effects in head and neck cancer cell lines that are independent of signalling in the EGFR pathway. *BMC Cancer* *12*, 368.

Tyler, K.L. (1998). Pathogenesis of reovirus infections of the central nervous system. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *233*, 93–124.

Tyler, K.L., Squier, M.K., Rodgers, S.E., Schneider, B.E., Oberhaus, S.M., Grdina, T.A., Cohen, J.J., and Dermody, T.S. (1995). Differences in the capacity of reovirus strains to induce apoptosis are determined by the viral attachment protein sigma 1. *J. Virol.* *69*, 6972–6979.

- Tyler, K.L., Squier, M.K., Brown, A.L., Pike, B., Willis, D., Oberhaus, S.M., Dermody, T.S., and Cohen, J.J. (1996). Linkage between reovirus-induced apoptosis and inhibition of cellular DNA synthesis: role of the S1 and M2 genes. *J. Virol.* *70*, 7984–7991.
- Tyler, K.L., 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.
- Urbanelli, L., Trivelli, F., Ercolani, L., Sementino, E., Magini, A., Tancini, B., Franceschini, R., and Emiliani, C. (2010). Cathepsin L increased level upon Ras mutants expression: the role of p38 and p44/42 MAPK signaling pathways. *Mol. Cell. Biochem.* *343*, 49–57.
- Vacchelli, E., Eggermont, A., Sautès-Fridman, C., Galon, J., Zitvogel, L., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2013). Trial watch: Oncolytic viruses for cancer therapy. *Oncoimmunology* *2*, e24612.
- Vanderplassen, A., Mathew, E., Hollinshead, M., Sim, R.B., and Smith, G.L. (1998). Extracellular enveloped vaccinia virus is resistant to complement because of incorporation of host complement control proteins into its envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 7544–7549.
- Vassilev, L.T. (2007). MDM2 inhibitors for cancer therapy. *Trends Mol. Med.* *13*, 23–31.
- Victoria, J.G., Kapoor, A., Dupuis, K., Schnurr, D.P., and Delwart, E.L. (2008). Rapid identification of known and new RNA viruses from animal tissues. *PLoS Pathog.* *4*, e1000163.
- Viral Zone (2014). Orthoreovirus. In *ViralZone*. Repéré à http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/105.html.
- Viswanathan, K., Früh, K., and DeFilippis, V. (2010). Viral hijacking of the host ubiquitin system to evade interferon responses. *Curr. Opin. Microbiol.* *13*, 517–523.
- Vogel, G. (2014). Are Bats Spreading Ebola Across Sub-Saharan Africa? *Science* *344*, 140–140.
- Wang, L.-F., Walker, P.J., and Poon, L.L.M. (2011). Mass extinctions, biodiversity and mitochondrial function: are bats “special” as reservoirs for emerging viruses? *Curr. Opin. Virol.* *1*, 649–657.
- Wang, Q., Bergeron, J., Mabrouk, T., and Lemay, G. (1996). Site-directed mutagenesis of the double-stranded RNA binding domain of bacterially-expressed sigma 3 reovirus protein. *Virus Res.* *41*, 141–151.

Ward, R., L., McNeal, M., M., Farone, M., B., and Farone, A., L. (2007). Chapter 9 - Reoviridae. In *The Mouse in Biomedical Research (Second Edition)*, J.G. Smith, ed. (Burlington: Academic Press), pp. 235–267. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123694546500376>.

Weber, J.D., Jeffers, J.R., Rehg, J.E., Randle, D.H., Lozano, G., Roussel, M.F., Sherr, C.J., and Zambetti, G.P. (2000). p53-independent functions of the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev.* *14*, 2358–2365.

Weiner, H.L., Ramig, R.F., Mustoe, T.A., and Fields, B.N. (1978). Identification of the gene coding for the hemagglutinin of reovirus. *Virology* *86*, 581–584.

Wessner, D.R., and Fields, B.N. (1993). Isolation and genetic characterization of ethanol-resistant reovirus mutants. *J. Virol.* *67*, 2442–2447.

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.

Wiebe, M.E., and Joklik, T.W. (1975). The mechanism of inhibition of reovirus replication by interferon. *Virology* *66*, 229–240.

Wilcox, M.E., Yang, W., Senger, D., Rewcastle, N.B., Morris, D.G., Brasher, P.M., Shi, Z.Q., Johnston, R.N., Nishikawa, S., Lee, P.W., et al. (2001). Reovirus as an oncolytic agent against experimental human malignant gliomas. *J. Natl. Cancer Inst.* *93*, 903–912.

Wilson, G.J., Wetzel, J.D., Puryear, W., Bassel-Duby, R., and Dermody, T.S. (1996). Persistent reovirus infections of L cells select mutations in viral attachment protein sigma1 that alter oligomer stability. *J. Virol.* *70*, 6598–6606.

Wilson, G.J., Nason, E.L., Hardy, C.S., Ebert, D.H., Wetzel, J.D., Venkataram Prasad, B.V., and Dermody, T.S. (2002). A single mutation in the carboxy terminus of reovirus outer-capsid protein sigma 3 confers enhanced kinetics of sigma 3 proteolysis, resistance to inhibitors of viral disassembly, and alterations in sigma 3 structure. *J. Virol.* *76*, 9832–9843.

Wisniewski, M.L., Werner, B.G., Hom, L.G., Anguish, L.J., Coffey, C.M., and Parker, J.S.L. (2011). Reovirus infection or ectopic expression of outer capsid protein micro1 induces apoptosis independently of the cellular proapoptotic proteins Bax and Bak. *J. Virol.* *85*, 296–304.

Van den Wollenberg, D.J.M., Dautzenberg, I.J.C., van den Hengel, S.K., Cramer, S.J., de Groot, R.J., and 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.

- Wong, A.H., Cheng, P.K.C., Lai, M.Y.Y., Leung, P.C.K., Wong, K.K.Y., Lee, W.Y., and Lim, W.W.L. (2012). Virulence potential of fusogenic orthoreoviruses. *Emerg. Infect. Dis.* *18*, 944–948.
- Wong, S., Lau, S., Woo, P., and Yuen, K.-Y. (2007). Bats as a continuing source of emerging infections in humans. *Rev. Med. Virol.* *17*, 67–91.
- Yan, X., Parent, K.N., Goodman, R.P., Tang, J., Shou, J., Nibert, M.L., Duncan, R., and Baker, T.S. (2011). Virion structure of baboon reovirus, a fusogenic orthoreovirus that lacks an adhesion fiber. *J. Virol.* *85*, 7483–7495.
- Yap, T.A., Brunetto, A., Pandha, H., Harrington, K., and Debono, J.S. (2008). Reovirus therapy in cancer: has the orphan virus found a home? *Expert Opin. Investig. Drugs* *17*, 1925–1935.
- Yoon, C.-H., Lee, E.-S., Lim, D.-S., and Bae, Y.-S. (2009). PKR, a p53 target gene, plays a crucial role in the tumor-suppressor function of p53. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 7852–7857.
- Yue, Z., and Shatkin, A.J. (1996). Regulated, stable expression and nuclear presence of retrovirus double-stranded RNA-binding protein sigma3 in HeLa cells. *J. Virol.* *70*, 3497–3501.
- Zeller, H.G., Karabatsos, N., Calisher, C.H., Digoutte, J.-P., Cropp, C.B., Murphy, F.A., and Shope, R.E. (1989). Electron microscopic and antigenic studies of uncharacterized viruses. III. Evidence suggesting the placement of viruses in the family Reoviridae. *Arch. Virol.* *109*, 253–261.
- Zhang, P., and Samuel, C.E. (2007). Protein kinase PKR plays a stimulus- and virus-dependent role in apoptotic death and virus multiplication in human cells. *J. Virol.* *81*, 8192–8200.
- Zhang, L., Chandran, K., Nibert, M.L., and Harrison, S.C. (2006). Reovirus mu1 structural rearrangements that mediate membrane penetration. *J. Virol.* *80*, 12367–12376.
- Zhang, L., Agosto, M.A., Ivanovic, T., King, D.S., Nibert, M.L., and Harrison, S.C. (2009). Requirements for the formation of membrane pores by the reovirus myristoylated micro1N peptide. *J. Virol.* *83*, 7004–7014.
- Zhang, X., Ji, Y., Zhang, L., Harrison, S.C., Marinescu, D.C., Nibert, M.L., and Baker, T.S. (2005). Features of reovirus outer capsid protein mu1 revealed by electron cryomicroscopy and image reconstruction of the virion at 7.0 Angstrom resolution. *Structure* *13*, 1545–1557.
- Zhang, Y., Wei, Y., Zhang, X., Cai, H., Niewiesk, S., and Li, J. (2014). Rational design of human metapneumovirus live attenuated vaccine candidates by inhibiting viral mRNA cap methyltransferase. *J. Virol.* *88*, 11411–11429.

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.

Annexe 1 : La réplication de réovirus dans des cellules de chauves-souris.

Dans cet article intitulé « **Transient high level mammalian reovirus replication in a bat epithelial cell line occurs without cytopathic effect** ». *Virus Res.* 2013 May;173(2):327-35 (Sandekian et al., 2013), nous avons démontré que les cellules de chauve-souris (Tb1.Lu) sont permissives à l'infection par réovirus, mais ne démontrent pas d'effets cytopathiques. De plus, la production virale régresse rapidement suite à l'infection. Ces cellules sécrètent également un fort taux de molécules antivirales. La transformation de ces cellules avec l'oncogène Ras n'a pas permis une meilleure réplication de réovirus. Étonnamment, ces cellules infectées sont en mesure de produire de faibles quantités de virus, mais résistent à une deuxième infection.

Contribution des auteurs :

J'ai étroitement supervisé les stagiaires et j'ai moi-même effectué plusieurs expériences (3 figures sur 8). L'article a été écrit par Dr Guy Lemay et moi-même. J'ai contribué à la création de figures et tableaux et ainsi qu'à la révision du manuscrit.

Research highlights

▶ Bat Tb1.Lu cells do not exhibit cytopathic effects during mammalian reovirus infection. ▶ Tb1.Lu cells are permissive to reovirus virions or infectious subviral particles but virus production rapidly decreases. ▶ Infected cells release an antiviral factor protecting against an unrelated virus. ▶ Transformed status of the cells does not apparently promote reovirus replication and “oncolysis”. ▶ Low level of virus is produced over time with concomitant resistance to further infection.

Transient high level mammalian reovirus replication in a bat epithelial cell line occurs without cytopathic effect

Véronique Sandekian, Debbie Lim, Patrick Prud'homme and Guy Lemay*

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

[*Corresponding author: Tel: +1 514 343 2422; fax: +1 514 343 5701](mailto:prudhomme@umontreal.ca)

Département de microbiologie et immunologie
Pavillon Roger-Gaudry
Université de Montréal
C.P. 6128, Succ. Centre-ville
Montréal (Québec)
H3C 3J7

Running title: Reovirus replication in a bat cell line

Keywords: Reovirus, Bat, Persistence, Interferon, Ras

Abstract:

Mammalian reoviruses exhibit a large host range and infected cells are generally killed; however, most studies examined only a few cell types and host species, and are probably not representative of all possible interactions between virus and host cell. Many questions thus remain concerning the nature of cellular factors that affect viral replication and cell death. In the present work, it was observed that replication of the classical mammalian reovirus serotype 3 Dearing in a bat epithelial cell line, Tb1.Lu, does not result in cell lysis and is rapidly reduced to very low levels. Prior uncoating of virions by chymotrypsin treatment, to generate infectious subviral particles, increased the initial level of infection but without any significant effect on further viral replication or cell survival. Infected cells remain resistant to virus reinfection and secrete an antiviral factor, most likely interferon, that is protective against the unrelated encephalomyocarditis virus. Although, the transformed status of a cell is believed to promote reovirus replication and viral “oncolysis”, resistant Tb1.Lu cells exhibit a classical phenotype of transformed cells by forming colonies in semisolid soft agar medium. Further transduction of Tb.Lu cells with a constitutively active Ras oncogene does not seem cell growth or reovirus effect on these cells. Infected Tb1.Lu cells can produce low-level of infectious virus for a long time without any apparent effect, although these cells are resistant to reinfection. The results suggest that Tb1.Lu cells can mount an unusual antiviral response. Specific properties of bat cells may thus be in part responsible for the ability of the animals to act as reservoirs for viruses in general and for novel reoviruses in particular. Their peculiar resistance to cell lysis also makes Tb1.Lu cells an attractive model to study the cellular and viral factors that determine the ability of reovirus to replicate and destroy infected cells.

1. Introduction (Section 1)

Mammalian reoviruses, as their name indicate, exhibit a large host-range and are able to infect most mammalian species and cell lines derived from these animals. Tropism for different cell types is also quite large, resulting in part from the binding to ubiquitous sialic acid and protein receptor JAM-A (reviewed by: Danthi et al., 2010), as well as unidentified sugars and possibly protein receptors (Antar et al., 2009; Chappell et al., 2000). However, proteolytic uncoating of the virus by lysosomal enzymes in the infected cell is often limiting (see for examples: Alain et al., 2007; Golden et al., 2002; Wetzel et al., 1997a,b). Alternatively, the secretion of proteases in the external milieu could likely promote virus infection in some tissues including tumoral microenvironment (Alain et al., 2006 ; Amerongen et al., 1994; Bass et al., 1990; Bodkin et al., 1989).

In the last 20 years, there has been a renewed interest for these viruses due to their ability to preferentially infect transformed cells (Alain et al., 2007; Coffey 1998; Duncan et al., 1978; Hashiro et al., 1977; Marcato et al., 2007; Norman et al., 2004; Rudd and Lemay, 2005; Shmulevitz et al., 2010; Smakman et al., 2005; Strong and Lee, 1996; Strong et al., 1998; reviewed by: Patrick et al., 2005), leading to present clinical studies for their use as virotherapeutic “oncolytic” agents against cancer cells (reviewed among others by: Black and Morris, 2012; Harrington et al., 2010; Kelly et al., 2009). This preferential replication and cytolysis could result from the presence of a constitutively active form of the Ras oncogene although other factors leading to cell immortalization and/or transformation are clearly involved, intensive research efforts are presently devoted to further clarify this aspect.

However, as for most viruses, studies of reovirus replication have been mostly performed in a few well-characterized cell types, mostly murine and human-derived. Furthermore, in the last few years, novel strains of reoviruses have been isolated from different animals species, especially wild bats, or in humans in contact with bats (Chua et al., 2007, 2008, 2011; Du et al., 2010; Kohl et al., 2012; Lelli et al., 2012; Pritchard et al., 2006; Thalmann et al., 2010; Wong et al., 2012). These animals present a special interest

since they are presently the object of intense studies as important reservoirs for many pathogenic and emerging viruses (reviewed in: Calisher et al., 2006; Hayman et al., 2012; Hughes et al., 2007; Wang, 2011; Wang et al., 2011; Wong et al., 2007). Some of the novel reoviruses are fusogenic and are thus quite different from the classically studied non-fusogenic mammalian orthoreoviruses. However, other strains are non-fusogenic and are more similar to the previous classical isolates.

In the present study, the replicative ability of a classical non-fusogenic mammalian reovirus was examined in a bat lung epithelial cell line. Transient replication was observed with production of infectious virus without any apparent cytopathic effect. Virus production rapidly declined although a low level of virus production was maintained over at least 2 months of cell culture. Infected cells produced and released an antiviral soluble factor that can protect against an unrelated virus, even at times when virus production was reduced to very low levels. Prior uncoating of the virus did not enhance cytopathic effect, indicating that a blockage in entry is not responsible for the lack of cytopathic effect, as expected from high level of virus replication in the absence of prior uncoating. The Tb1.Lu cells exhibit a transformed phenotype, as demonstrated by their ability to form colonies in semisolid medium and further addition of a constitutively active Ras oncogene did not seem to affect virus infection or its effect on the host cells.

2. Materials and methods (Section 2)

2.1. Cells and viruses

L929 mouse fibroblasts and Vero cells (African green monkey kidney cells) were originally obtained from the American (ATCC) and were grown in minimal Eagle medium (MEM) with 5% fetal bovine serum, 1% penicillin and streptomycin (P/S) and 1% L-glutamine from commercial stock solutions (Wisent Bioproducts). Tb1.Lu Mexican free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis*) lung epithelial cells were a generous gift from the

laboratory of Heinz Feldmann (Public Health Agency of Canada, Winnipeg, Canada) and were originally from ATCC (ATCC[®] Number CCL-88TM). Tb1.Lu were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) with 10% fetal bovine serum, 1% P/S, 1% L-glutamine and 1% non-essential amino acids from commercial stock solutions (Wisent Bioproducts). Phoenix-ampho packaging cells (a generous gift from Gerardo Ferbeyre, Université de Montréal) were grown in DMEM with 10% fetal bovine serum, 1% P/S and 1% L-glutamine. Mouse NIH-3T3 fibroblasts were originally obtained from Yvan Robert Nabi (Life Sciences Institute of Cell and Developmental Biology, University of British Columbia) and were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) with 10% fetal bovine serum, 1% P/S, 1% L-glutamine, 1% non-essential amino acids and 1% vitamins from commercial stock solutions (Wisent Bioproducts) .

Clones of Tb1.Lu cells were obtained by two methods. The method used for clones 1-3 is limiting dilution in 96-wells plates. Individual clones resulting from the growth of a single cell were then trypsinized, grown in 35mm plates and propagated before being infected. The other method used for clones 4 and 5 is trypsinization of well-isolated colonies using small pieces of filter paper wetted with trypsin. Individual colonies were grown in 24-wells plates and propagated before being infected.

Wild-type reovirus used for most experiments was a laboratory stock derived from a pure plaque of reovirus serotype 3 strain Dearing (T3/Human/Ohio/Dearing/55; referred to as T3D); in early experiments, the serotype 1 strain Lang (T1/Human/Ohio/Lang/1953; referred to as T1L) was also used. Both original inocula were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC).

For the preparation of ISVPs, L929 cells were infected at a MOI of 2 PFU/cell in the absence of serum; following three cycles of freeze-thaw, chymotrypsin treatment (Sigma Type I-S from bovine pancreas) at 10µg/ml for 30 min at 37°C was done by direct addition of chymotrypsin to the virus-containing medium. The reaction was then stopped by addition of 2% heat-inactivated fetal bovine serum.

Wild-type EMC virus (murine encephalomyocarditis virus) was a generous gift from Serge Dea (Institut Armand-Frappier, Laval, Qc, Canada) and was originally obtained from ATCC.

2.2. Antibodies

Hybridoma cell lines producing either anti- σ 3 (4F2) or anti- μ 1 (10F6) have been described (Virgin et al., 1991) and were a generous gift from Kevin Coombs (Winnipeg University). Hybridoma cells were grown in MEM for suspension culture with 10% fetal bovine serum, proline (20 μ g/ml) and β -mercaptoethanol (50 μ M), antibodies were recovered as previously described (Brochu-Lafontaine and Lemay, 2012). The FITC-conjugated goat antireovirus antibody was obtained from Accurate Chemical & Scientific Corporation (catalog # YV0031-10).

2.3. Determination of virus replication

At different times post-infection, infected cells in petri dishes were frozen directly with culture medium and submitted to three cycles of freeze–thaw before being titrated. Alternatively, medium was removed and separately frozen while fresh medium was added to the cells before being frozen and submitted to three cycles of freeze–thaw, as before.

Virus titers were determined by plaque assay on Vero cells in the presence of chymotrypsin (Sigma Type I-S from bovine pancreas) at 10 μ g/ml, as previously described (Brochu-Lafontaine and Lemay, 2012).

2.3. Immunoblotting

Infected cells were recovered by scraping in small volume of medium and centrifuged in an Eppendorf tube at 13 000 g for 5 min at 4°C. Cell pellets were

resuspended in permeabilization buffer (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40) and left on ice for 5 min before centrifugation at maximum speed for 1 min in an Eppendorf centrifuge at 4°C. Proteins were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting. Nitrocellulose membrane (Whatman Protran BA85) was blocked with 2% non-fat dry milk dissolved in TBS (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, 150 mM NaCl) and sequentially incubated for 1 h at room temperature with the anti- σ 3 and anti- μ 1 monoclonal antibodies. Antibodies in tissue culture medium were diluted with an equal volume of TBS containing the blocking agent and directly used. The diluted antibody solution was recovered and kept at 4°C with 1mM sodium azide to be used up to 10 times. Membranes were washed in TBS containing 1% Tween-20. Binding of primary antibody was detected by reaction with peroxidase-conjugated secondary antibody and chemiluminescent substrate, as recommended by the manufacturer (Pierce SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate). Images were obtained using Kodak BioMax Light Film.2.3 or on a Typhoon Trio™ imager (GE Healthcare Life Sciences) with Image Quant v2005 software; when necessary, quantitation was done with the same software.

2.5. Quantitation of reovirus-infected cells by FACS

Quantitation of reovirus-infected cells by FACS was done essentially as described by others (Marcato et al., 2007), with modifications. Briefly, cells from a 6-wells plate were collected by trypsinization at 37°C for 5 min and resuspended in 1ml of DMEM containing 10% fetal bovine serum before recovery by centrifugation at 4°C for 5 min at 1500 x g. The pellet was resuspended in 0.25ml of Cytotfix/Cytoperm (Becton Dickinson) on ice with gentle agitation and left 20 min before centrifugation at 1500 x g at 4° for 5 min. Cells were then resuspended in the 0.25 ml Perm Wash buffer (Becton Dickinson) centrifuged again and resuspended in 0.035ml of buffer to which 0.015 ml of FITC-conjugated antireovirus antibody was added. Following 30 min on ice with occasional gentle agitation, cells were pelleted, washed twice in buffer, and fixed with 4%

paraformaldehyde before being analyzed on a BD FACSCalibur cytofluorometer (Becton Dickinson).

2.6. Detection of secreted antiviral molecule.

L929 or Tb1.Lu cells were infected with wild-type reovirus type 3 Dearing at a multiplicity of infection of 5 and the supernatant was recovered 12 h post-infection. This supernatant (5 ml) was then placed in a 100mm-diameter petri dish and irradiated using the U.V. light of the tissue culture hood for 1 h; in these conditions, infectious reovirus titer was reduced to less than the amount that can be detected in the assay used for detection of a secreted antiviral molecule. This irradiated supernatant was then used as medium in EMC virus titration by TCID₅₀ on Tb1.Lu cells. Briefly, tenfold dilution of the EMC virus samples were prepared and used to infect one row (10 wells) of a 96-wells microplate of Tb1.Lu cells. For each well, a volume of 50µl of virus dilution in serum-free MEM was used. Plates were left at 4°C for 1 h before addition of 100µl per well of the recovered U.V. treated supernatant. Plates were incubated for 3–4 days and examined by phase-contrast microscopy for the presence of cytopathic effects. The plates were then fixed with 4% formaldehyde in PBS for 1 h before being washed with PBS and stained with methylene blue for 1 h. Plates were then washed with PBS and tap water. When dry, methylene blue was solubilized in 100µl of 0.1N HCl for easier visualization.

2.7. Introduction of a constitutively active Ras oncogene in Tb1.Lu and control NIH-3T3 cells.

Phoenix-ampho packaging cells (Swift et al., 2001) were plated at a density of 4×10^6 cell per 100mm petri dish. The next day, cells were transfected using the calcium-phosphate precipitation method. PWZL-hygro control vector and PWZL-hygro Ras vector (Ferbeyre et al., 2000) were used at a concentration of 40µg/ml. The next morning, sodium butyrate was added at a final concentration of 10 mM and medium was changed

in the afternoon. Twenty-four hours later, supernatants containing the retroviruses encoding the constitutively active Ras oncogene (H-Ras^{G12V}) or the control empty vector control were filtered through a 0.45µm filter and added to Tb1.Lu cells. Polybrene (Hexadimethrine Bromide, Sigma #H-9268) was added at a final concentration of 4µg/ml and 10% of fetal bovine serum was also added to the medium containing the retroviruses. Fresh medium was added to phoenix-ampho cells. The same retroviral transduction was repeated two other times within 12 h for each infection. Finally, fresh medium was added to transduced Tb1.Lu cells and 200µg/ml of hygromycin (cat no.10843555001, Roche) was added to each petri dish for selection of stably transduced cells. Selection was pursued 3 days at 37°C in the CO₂ incubator. Tb1.Lu Control and Tb1.Lu Ras-transformed cells were then maintained in the same medium than the original Tb1.Lu cells with periodic addition of 200 µg/ml of hygromycin. Phoenix-ampho cells, PWZL-hygro vectors and protocols were kindly provided by Gerardo Ferbyere, Université de Montréal.

2.8. Cell transformation assay: formation of colonies in semisolid medium

Cells were trypsinized and seeded in 6-wells plates at different cell concentrations (50 000, 10 000 and 2000 cells per well) by mixing in complete culture medium containing 0.4% Noble agar (Difco) and overlaying over a preformed 0.8% Noble agar layer, also in complete medium. When medium has hardened, a layer of liquid medium was added on top and was subsequently changed each 3 days. After 14 days of cell growth, liquid medium was removed and replaced for 2 h with medium without serum before being replaced again with 10% formaldehyde in PBS for cell fixation. Fixative was removed after 1 h at room temperature and cell colonies were stained by adding 0.01% crystal violet in PBS for 1 h at room temperature, followed by extensive washing in PBS .

3. Results (Section 3)

3.1. Absence of reovirus-induced cytopathic effect in reovirus-infected Tb1.Lu cells

Bat cells are poorly studied as *in vitro* models of reovirus infection and replication. Therefore, it was first sought to know if reovirus could replicate efficiently in an epithelial lung cell line (Tb1.Lu cells) which originates from the Mexican free-tailed bat (*T. brasiliensis*). Infection with the wild-type reovirus serotype 3 Dearing in L929 cells, the classical model for reovirus' replication, was compared with that of Tb1. Lu cells. As seen in **Fig.1A**, L929 cells infected at an MOI of 3 pfu/cell already showed clear signs of viral-induced cell lysis at 48 h post-infection and, as expected, were completely killed between 3 and 5 days post-infection at either MOI of 0.3 or 3 pfu/cell (**data not shown**). In contrast, Tb1.Lu cells remained alive and without clear signs of cell lysis or reovirus-associated cytopathic effect at either MOI even at 20 days post-infection (**Fig. 1B**).

In order to determine whether the absence of cell lysis could be due to an overall resistance of Tb1.Lu cells to viral-induced cytopathic effects, cells were subjected to infection with the unrelated murine encephalomyocarditis virus (EMC), a single-stranded RNA virus of the *Picornaviridae* family. Significant cell death was observed as early as 24h post-infection and increased at 72h post-infection (**Fig. 1C**). The resistance of Tb1.Lu cells to reovirus-induced cytopathic effect is therefore somewhat limited to certain viruses and apparently does not reflect an overall resistance of these cells.

3.2. Tb1.Lu cells support reovirus replication despite absence of cytopathic effect.

To determine if reovirus actually infects and replicates in Tb1.Lu cells, cultures of infected cells were recovered at different times post-infection and submitted to three cycles of freeze–thaw before virus titration, as described in Section 2. Virus replication was detected from 48 h, total virus produced stabilizes between 3 and 6 days and total amount remained constant thereafter, suggesting transient replication despite absence of cell lysis (data not shown). In order to further examine virus production, infected cells and

their supernatants were separately recovered at different times post-infection before freeze-thaw and virus titration. Since there was no cell passage nor change of medium, this experiment thus examine the accumulation of infectious virus over time. Again, viral replication was clearly observed and virus release in the supernatant was observed despite absence of cell lysis. A peak of infectious virus was observed around 48-72 h post-infection and then decreased gradually inside the cells and remained constant in the supernatant. Total infectious virus production and final viral titers were similar in L929 cells (after 24 h) and Tb1.Lu cells at the 48-72 h peak (data not shown). This confirms that virus replication actually occurs and decreases after peak replication and that the virus present in the supernatant was produced in the first few days (**Fig. 2A**).

In parallel of the last experiment, cell lysates from infected cells with either serotype 1 (T1L) and serotype 3 (T3D) virus was recovered for western blot analysis (**Figure 2B**). Viral proteins were easily observed in parallel with the increase in virus titer. Although viral proteins in T1L-infected cells were detected at earlier times, a similar decrease at later times was observed with both viruses and no significant cell death was observed in either cases; this is also consistent with similar amounts of total proteins, as detected by Coomassie blue staining, for either infected or control mock-infected cells. Increasing the multiplicity of infection to 50 did not seem to enhance cytopathic effect in any significant way. Infected cells at either MOI could be kept for up to 50 days without any apparent effect on cell survival (**data not shown**).

3.3. Infection of individual Tb1.Lu cells in the cell culture

Although there was no visible cell death in all previous experiments, the possibility remains that only a small fraction of the cells transiently produce large amount of viruses and are eliminated from the cell culture. To further study this aspect, an intracellular FACS assay was used to determine the percentage of infected cells, producing detectable amounts of viral proteins, as described in Section 2.

In a first experiment, a percentage of close to 50% of infected cells was reached by 4 days post-infection (**Fig. 3A**). These percentages remained constant if cells were kept without passage but decreased rapidly upon cell passage. The decrease associated with cell passage was also observed at the level of viral proteins by immunoblotting analysis (**Fig. 2B** and data not shown). Increasing the multiplicity of infection from 5 to 50 PFU/ml did increase the percentage of infected cells but not cell death, as previously observed. The relatively high percentage of infected cells suggests that the presence of cellular subpopulations differing in sensitivities to virus-induced cell lysis is unlikely to be responsible for the overall resistance of the cell population.

In order to further verify if the presence of subpopulations of cells could explain that some cells remain uninfected, cell clones were obtained by recovering colonies of well-isolated cells following culture at low cell density, as described in Section 2, and individually propagated before infection. Although the exact percentage of infected cells was somewhat variable from experiment to experiment, five different clones that were analyzed did not present striking differences in the percentage of infected cells and were also similar to the original cell population when examined in parallel (**Fig. 3B**); in addition, there was no evident cytopathic effect in these different cell clones, suggesting that all cells in the culture can be infected but are similarly resistant to virus-induced cytopathic effects.

3.4. Limited uncoating is not mainly responsible for the phenotype of Tb1.Lu cells to reovirus.

As mentioned in the introduction, the ability to uncoat the reovirus virions to generate infectious subviral particles (ISVPs) is often a limiting factor for viral replication. To determine if deficient uncoating could explain the resistance of Tb1.Lu cells, despite obvious viral production in these cells, the infection by virions and *in vitro* generated ISVPs, following chymotrypsin treatment, was compared. Vero cells were used as controls since these cells can be infected by reovirus even though they exhibit a limited

capacity to uncoat the virus (Golden et al., 2002); hence, ISVP infects Vero cells more efficiently than virions. At 48 h post-infection, a similar small percentage of Vero and Tb1.Lu cells was infected with virions while Vero cells infected with ISVPs were essentially all killed (data not shown). At later times (6 days post-infection), most of infected Tb1.Lu cells survived and a higher percentage of cells were infected by ISVP than virions (**Fig. 4A**). Kinetics of infectious virus produced was also examined and confirmed faster replication of ISVPs, compared to virions, with similar virus titers at later times (**Fig. 4B**). Faster kinetics of infection by ISVPs compared to virions suggest that inefficient virus uncoating limits reovirus infection in Tb1 cells but only to a certain extent; bypassing the uncoating step with ISVPs is not sufficient to increase cell lysis nor final viral production. Cells initially infected by ISVPs, as well as those initially infected by virions, could be kept for a long time without apparent cytopathic effect.

3.5. Secretion of an antiviral molecule by Tb1.Lu cells early after reovirus infection.

One possible explanation for Tb1.Lu cells resistance to reovirus-induced cytopathic effect, and rapid decrease in virus produced, could be the presence of a strong antiviral mechanism in these cells; one likely possibility is the secretion of an antiviral factor, such as interferon. Since reovirus serotype 1 Lang is known to be more resistant to this cellular defense mechanism both at the level of induction and sensitivity (Jacobs and Ferguson, 1991; Zurney et al., 2009), this will be consistent with the previous observation that this virus isolate was slightly more efficient in infecting Tb1.Lu cells than was serotype 3 Dearing.

The ability of Tb1.Lu cells to secrete an antiviral molecule was thus examined by recovering supernatants of reovirus-infected cells at 12 h post-infection and testing its antiviral ability on an unrelated virus, namely the murine encephalomyocarditis virus, as an indicator virus that is highly sensitive to interferon. Interestingly, while supernatants of reovirus-infected L929 cells only reduced apparent EMC titer by approximately 4-fold under these conditions, the supernatant from Tb1.Lu cells exhibited a strong antiviral

activity, being able to reduce apparent EMC titer by more than a thousandfold (**Fig. 5**). This suggests the induction and secretion of a strong antiviral factor, most likely interferon, early during infection of these cells, that may be responsible for the rapid decline in synthesis of viral proteins and infectious virus production, possibly also explaining the lack of concomitant cytopathic effect.

3.6. Introduction of a constitutively active form of Ras in Tb1.Lu cells does not affect reovirus replication and virus-induced cytopathic effects.

As mentioned in the introduction, expression of a constitutively active form of Ras, or activation of Ras signaling pathway, could transform some immortalized nontransformed cells, such as murine NIH-3T3 cells. This results in an increased reovirus replication and/or virus-induced cell lysis or apoptosis (see for examples: Alain et al., 2007; Norman et al., 2004; Marcato et al., 2007; Rudd and Lemay, 2005; Shmulevitz et al., 2010; Smakman et al., 2005; Strong and Lee, 1996; Strong et al., 1998) and forms the basis of the so-called “oncolytic” activity of the virus. One possibility for the resistance of Tb1.Lu cells to reovirus could thus result from lack of Ras activation and non-transformed status of these cells. In order to determine if increased permissivity or sensitivity of Tb1.Lu cells could be achieved by cellular transformation, cells were infected with a retroviral vector encoding the constitutively active H-Ras^{V12}, as described in Section 2; transduced cells were selected for hygromycin resistance encoded by the vector and will be referred to as Tb1.Lu Ras. As a control, cells were similarly transduced with an empty vector (Tb1.Lu ctl).

The cells were first examined for their ability to behave as transformed cells using the soft agar colony formation assay (**Fig. 6**). Surprisingly, both the Tb1.Lu ctl and Tb1.Lu Ras cells could form colonies in soft agar with similar efficiencies (approximately 30–40% of seeded cells formed visible colonies after 14 days). This contrasts with the classical model of parental NIH-3T3 versus NIH-Ras cell lines that is presented as a comparison; in this case there was no visible colonies after 14 days in cells transduced

with the control vector; even under the microscope, most cells were found to remain individual in this case (data not shown). Efficiency of colony formation in both Tb1.Lu-Ctl and Tb1.Lu-Ras was similar to that of NIH-Ras cells. This suggests that the original Tb1.Lu cells were already behaving as transformed cells and that further addition of H-Ras^{V12} does not further affect cellular transformation, at least as assessed by this assay.

The infection by reovirus was nevertheless examined in Tb1.Lu-Ctl and Tb1.Lu-Ras cells. Viral proteins at different times post-infection were examined by immunoblotting and indicates only a small increase, less than twofold upon quantitation, in Tb1.Lu-Ras cells (**Fig. 7**); furthermore, both cell lines resisted reovirus-induced cytopathic effect and could be passaged for up to 2 months without any apparent effect on cell survival. This indicates that oncogenic Ras does not have a significant effect on reovirus infectivity, or cell-induced cytopathic effect, in this cell type and lack of activation of Ras signaling pathways is unlikely to explain the resistance of these cells.

3.7. Long-term infection of Tb1.Lu cells.

In order to clarify if the virus is eventually cleared from infected cells, these were kept for up to a month in two different conditions. In one case, medium was changed twice a week but cells were never passaged; it was found that these cells can actually remain viable under these conditions and can then be passaged with a minimum loss of viability. Another culture of infected cells was rather trypsinized twice a week at the same cell concentration each time; again, there was no apparent change in growth properties of these cells and the number of cells remained essentially constant at all time.

Infectious virus production was then measured in the supernatant by virus titration, as well as remaining infectious virus present intracellularly. The amount of infectious virus remained high in the cell culture when cells were not passaged (data not shown), despite the fact that there was no cell killing nor apparent cytopathic effect. In contrast, virus production was reduced by at least a thousandfold compared to acutely infected cells

when cells were regularly passaged, suggesting the need for constant reinfection to maintain the virus in dividing cells (**Fig. 8**, compare panels A and B). Infectious virus was also found to be released in the supernatant of either growing or stationary cells (data not shown). When the same experiment was repeated with either control or Ras-transduced cells, virus production was still observed in both cases even after 2 months (data not shown).

In order to determine if the cells could be reinfected by the virus, infection was carried out in both the passaged mock-infected and infected cells in parallel with the original Tb1.Lu cells and titers of infectious viruses were determined. Clearly, the presence of the virus, although very reduced in the passaged culture, was sufficient to prevent any further reinfection, probably by maintaining the presence of the soluble antiviral factor (**Fig.8**).

Virus released from late-infected cells was also recovered and used to infect either L929 or fresh Tb1.Lu cells; while L929 cells were readily killed by the infection, Tb1.Lu cells resisted to this virus, as well as to the original wild-type virus (data not shown). There is thus no evidence that the “adapted” virus has evolved to acquire more cytopathogenicity toward the Tb1.Lu cells.

Discussion (Section 4)

In the last few years, different reoviruses have been found in various species of bats. In this project, *in vitro* replication of a classical mammalian reovirus was examined in bat cells. These cells differ from most *in vitro* cellular models of reovirus infection since no cytopathic effect was observed despite viral replication and release in the external medium. The mechanism of virus release from these cells remains to be explored. In the closely related avian reovirus, as well as in rotavirus, another member of the *Reoviridae* family, it has been observed that autophagy contributes to virus replication and/or propagation (Meng et al., 2012; Crawford et al., 2012). It cannot be excluded that autophagy could be involved in nonlytic virus release in Tb1.Lu cells, as well as during

viral persistence in these and other cell types. Alternatively, recent data indicate a recycling mechanism from endocytic compartments to the cell surface (Mainou and Dermody, 2012) that may be also used in the case of nonlytic virus release.

Bat Tb1.Lu cells were previously shown to support persistent infection with Ebola virus (Strong et al., 2008). However, the absence of cell death and establishment of persistence following virus infection is not a general property of Tb1.Lu cells since they were readily infected and killed by encephalomyocarditis virus.

Among the different cell lines that have been examined over the years, and that can actually support a productive reovirus infection, some of these nevertheless exhibit partial resistance to viral induced cell death at early times post-infection while eventually becoming persistently infected (see for examples: Alain et al., 2006; Danis et al., 1993; Kim et al., 2007; Taber et al., 1976; Verdin et al., 1986). However, detailed data of the kinetics and long-term cultures of infected cells is lacking in most cases and a significant percentage of cell death occurs at early times post-infection in all cases, in contrast with the situation observed with Tb1.Lu cells. The only case where persistent infection was established without a prior phase of actual cell death is a single report in MDCK cells (Montgomery et al., 1991), although the cells still exhibited limited cell growth once infected. Furthermore, in our laboratory, MDCK cells were found to be killed upon reovirus infection (Danis and Lemay, 1993; Bisailon et al., 1999). Recent data indicate that the fate of infected MDCK cells depends on postentry events that are regulated by a specific viral protein varying between type 1 Lang and type 3 Dearing virus strains (Ooms et al., 2010), differences between virus stocks could thus possibly explain these conflicting results between laboratories. In the present manuscript, there was no striking difference between the Lang and Dearing strain for the replication in Tb1.Lu cells and most of the present work only used the latter strain. However, it will certainly be interesting to examine different virus mutants for their ability to replicate and eventually kill infected cells.

In most cell lines, long-term infection results in viral persistent infection with resulting virus-cell coevolution (Dermody et al., 1993; Wetzel et al., 1997b; reviewed by: Dermody, 1998). In the few cases examined to date, amino acids substitutions in the $\sigma 3$ protein were consistently observed in the viruses recovered from persistently infected cells (Wetzel et al., 1997b; Kim et al., 2010). In the viruses from persistently infected L929 cells, these substitutions were shown to increase viral uncoating by small amounts of lysosomal proteases, resulting in an ability to infect cells that possess a limiting amount of these enzymes, as observed in the persistently infected cells (reviewed by: Dermody, 1998). With viruses obtained from “persistently infected” Tb1.Lu cells, the lack of cytopathic effect of these viruses on Tb1.Lu cells, and the limited impact of prior uncoating of the original virus, suggests that it is unlikely that the virus has actually evolved to acquire a better efficiency of uncoating.

The exact reasons for the resistance of Tb1.Lu cells to cytopathic effects following reovirus infection thus remain elusive. It has been well established that in immortalized yet nontransformed cells, such as NIH-3T3 cells, reovirus replication is blocked, but the ability of Tb1.Lu cells to form colonies in soft agar and lack of effect of retroviral transduction of an activated Ras suggest that the situation is different in Tb1.Lu cells. The lack of effect of Ras transduction could indicate that the Ras signaling pathway is already directly or indirectly activated in these cells or that the cells are transformed by a completely different pathway.

The most probable explanation for the resistance of Tb1.Lu cells remains the production of high amounts of a potent antiviral molecule by the infected cells. The resistance of persistently infected cells to further reinfection is most probably due to the constant secretion of this same molecule, as previously observed in persistently infected SC1 cells (Danis et al., 1997). The exact nature of this “antiviral molecule” was not established in the present study. However, it is active against both the original inducing virus and an unrelated virus, is secreted from the cells, and is resistant to UV irradiation; altogether this is clearly consistent with interferon. A soluble antiviral-factor, considered to be interferon, has also been previously reported in primary cells of *T. brasiliensis*

(Stewart et al., 1969); the bat species from which Tb1.Lu cells originate. Although, there is still relatively few studies of the innate immune response in different bat species (Baker et al., 2013), evidence are now rapidly accumulating for the presence of variety of active immune genes in bat, including pattern recognition receptors, as well as interferons and interferon stimulated genes (see for examples: Biesold et al., 2011; Papenfuss et al., 2012; Zhou et al., 2011). The presence of an active innate immune response is thus likely to be critical in the ability of bats to serve as virus reservoirs of a diverse array of viruses.

Altogether, this work suggests that bat cells possess unusual properties that may be important in the ability of the animals to act as reservoirs for reoviruses, by establishment of persistent productive infection regulated by a soluble antiviral factor; this could well contribute to the emergence of more pathogenic viruses in these animals. The present work also further stresses the need to examine virus replication in a wide range of cells from different species and tissue origins, including different species of bats, as these cells are becoming more widely available (for examples: Crameri et al., 2009; Krähling et al., 2010). The resistance of Tb1.Lu cells also makes them an attractive model to examine the effect of innate immune response and of various signaling pathways on viral replication and virus-induced cytopathic effects (Baker et al., 2013).

Acknowledgments

We express our gratitude to Benoît Crevier for his participation during initial parts of this work. We would also like to thank Serge Sénéchal for his technical support in FACS analysis and Marie-France Gaumont-Leclerc for her help with viral transduction protocols.

This work was supported by an operating grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to G.L. D.L. and P.P. were also supported by NSERC summer studentships. We also thank the “Faculté des études supérieures” of “Université de Montréal” for partial financial support to V.S.

References

- Alain, T., Kim, M., Johnston, R.N., Urbanski, S., Kossakowska, A.E., Forsyth, P.A., Lee, P.W.K., 2006. The oncolytic effect in vivo of reovirus on tumour cells that have survived reovirus cell killing in vitro. *British Journal of Cancer* 95, 1020–1027.
- Alain, T., Kim, T.S., Lun, X., Liacini, A., Schiff, L.A., Senger, D.L., Forsyth, P.A., 2007. Proteolytic disassembly is a critical determinant for reovirus oncolysis. *Molecular Therapy* 15, 1512–1521.
- Amerongen, H.M., Wilson, G.A., Fields, B.N., Neutra, M.R., 1994. Proteolytic processing of reovirus is required for adherence to intestinal M cells. *Journal of Virology* 68, 8428–8432.
- Antar, A.A.R., Konopka, J.L., Campbell, J.A., Henry, R.A., Perdigoto, A.L., Carter, B.D., Pozzi, A., Abel, T.W., Dermody, T.S., 2009. Junctional adhesion molecule-A is required for hematogenous dissemination of reovirus. *Cell Host and Microbe* 5, 59–71.
- Baker, M.L., Schountz, T., Wang, L.F., 2013. Antiviral immune responses of bats: a review. *Zoonoses and Public Health* 60, 104–116.
- Bass, D.M., Bodkin, D., Dambrauskas, R., Trier, J.S., Fields, B.N., Wolf, J.L., 1990. Intraluminal proteolytic activation plays an important role in replication of type 1 reovirus in the intestines of neonatal mice. *Journal of Virology* 64, 1830–1833.
- Biesold, S.E., Ritz, D., Gloza-Rausch, F., Wollny, R., Drexler, J.F., Corman, V.M., Kalko, E.K.V., Oppong, S., Drosten, C., Müller, M.A., 2011. Type I interferon reaction to viral infection in interferon-competent, immortalized cell lines from the African fruit bat *Eidolon helvum*. *Public Library of Science ONE* 6, e28131.

- Bisaillon, M., Sénéchal, S., Bernier, L., Lemay, G., 1999. A glycosyl hydrolase activity of mammalian reovirus sigma1 protein can contribute to viral infection through a mucus layer. *Journal of Molecular Biology* 286, 759–773.
- Black, A.J., Morris, D.G., 2012. Clinical trials involving the oncolytic virus, reovirus: ready for prime time? *Expert Review of Clinical Pharmacology* 5, 517–520.
- Bodkin, D.K., Nibert, M.L., Fields, B.N., 1989. Proteolytic digestion of reovirus in the intestinal lumens of neonatal mice. *Journal of Virology* 63, 4676–4681.
- Brochu-Lafontaine, V., Lemay, G., 2012. Addition of exogenous polypeptides on the mammalian reovirus outer capsid using reverse genetics. *Journal of Virological Methods* 179, 342–350.
- Calisher, C.H., Childs, J.E., Field, H.E., Holmes, K.V., Schountz, T., 2006. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clinical Microbiology Reviews* 19, 531–545.
- Chappell, J.D., Duong, J.L., Wright, B.W., Dermody, T.S., 2000. Identification of carbohydrate-binding domains in the attachment proteins of type 1 and type 3 reoviruses. *Journal of Virology* 74, 8472–8479.
- Chua, K.B., Cramer, G., Hyatt, A., Yu, M., Tompang, M.R., Rosli, J., McEachern, J., Cramer, S., Kumarasamy, V., Eaton, B.T., Wang, L.-F., 2007. A previously unknown reovirus of bat origin is associated with an acute respiratory disease in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 11424–11429.
- Chua, K.B., Voon, K., Cramer, G., Tan, H.S., Rosli, J., McEachern, J.A., Suluraju, S., Yu, M., Wang, L.-F., 2008. Identification and characterization of a new orthoreovirus from patients with acute respiratory infections. *Public Library of Science ONE* 3, e3803.

- Chua, K.B., Voon, K., Yu, M., Keniscope, C., Abdul Rasid, K., Wang, L.-F., 2011. Investigation of a potential zoonotic transmission of orthoreovirus associated with acute influenza-like illness in an adult patient. *Public Library of Science ONE* 6, e25434.
- Coffey, M.C., 1998. Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway. *Science* 282, 1332–1334.
- Crameri, G., Todd, S., Grimley, S., McEachern, J.A., Marsh, G.A., Smith, C., Tachedjian, M., De Jong, C., Virtue, E.R., Yu, M., Bulach, D., Liu, J.P., Michalski, W.P., Middleton, D., Field, H.E., Wang, L.F., 2009. Establishment, immortalisation and characterisation of pterid bat cell lines. *Public Library of Science ONE* 4, e8266.
- Crawford, S.E., Hyser, J.M., Utama, B., Estes, M.K., 2012. Autophagy hijacked through viroporin-activated calcium/calmodulin-dependent kinase kinase- β signaling is required for rotavirus replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (advanced online publication).
- 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. *Biochemistry and Cell Biology* 71, 81–85.
- Danis, C., Mabrouk, T., Garzon, S., Lemay, G., 1993. Establishment of persistent reovirus infection in SC1 cells: absence of protein synthesis inhibition and increased level of double-stranded RNA-activated protein kinase. *Virus Research* 27, 253–265.
- Danis, C., Mabrouk, T., Faure, M., Lemay, G., 1997. Interferon has no protective effect during acute or persistent reovirus infection of mouse SC1 fibroblasts. *Virus Research* 51, 139–149.
- Danthi, P., Guglielmi, K.M., Kirchner, E., Mainou, B., Stehle, T., Dermody, T.S., 2010. From touchdown to transcription: the reovirus cell entry pathway. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 343, 91–119.

- Dermody, T.S., 1998. Molecular mechanisms of persistent infection by reovirus. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 233, 1–22.
- Dermody, T.S., Nibert, M.L., Wetzel, J.D., Tong, X., Fields, B.N., 1993. Cells and viruses with mutations affecting viral entry are selected during persistent infections of L cells with mammalian reoviruses. *Journal of Virology* 67, 2055–2063.
- Du, L., Lu, Z., Fan, Y., Meng, K., Jiang, Y., Zhu, Y., Wang, S., Gu, W., Zou, X., Tu, C., 2010. Xi river virus, a new bat reovirus isolated in southern China. *Archives of Virology* 155, 1295–1299.
- Duncan, M.R., Stanish, S.M., Cox, D.C., 1978. Differential sensitivity of normal and transformed human cells to reovirus infection. *Journal of Virology* 28, 444–449.
- Ferbeyre, G., de Stanchina, E., Querido, E., Baptiste, N., Prives, C., Lowe, S.W., 2000. p53 is induced by oncogenic Ras and promotes premature senescence. *Genes & Development* 14, 2015–2027.
- Golden, J.W., Linke, J., Schmechel, S., Thoenke, K., Schiff, L.A., 2002. Addition of exogenous protease facilitates reovirus infection in many restrictive cells. *Journal of Virology* 76, 7430–7443.
- 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 Reviews* 21, 91–98.
- Hashiro, G., Loh, P.C., Yau, J.T., 1977. The preferential cytotoxicity of reovirus for certain transformed cell lines. *Archives of Virology* 54, 307–315.
- Hayman, D.T.S., Bowen, R.A., Cryan, P.M., McCracken, G.F., O'Shea, T.J., Peel, A.J., Gilbert, A., Webb, C.T., Wood, J.L.N., 2012. Ecology of zoonotic infectious diseases in bats: current knowledge and future directions. *Zoonoses and Public Health* 60, 2–21.

- Hughes, J.M., Wilson, M.E., Halpin, K., Hyatt, A.D., Plowright, R.K., Epstein, J.H., Daszak, P., Field, H.E., Wang, L., Daniels, P.W., Henipavirus Ecology Research Group, 2007, Emerging viruses: coming in on a wrinkled wing and a prayer. *Clinical Infectious Diseases* 44, 711–717.
- Jacobs, B.L., Ferguson, R.E., 1991. The Lang strain of reovirus serotype 1 and the Dearing strain of reovirus serotype 3 differ in their sensitivities to beta interferon. *Journal of Virology* 65, 5102–5104.
- Kelly, K., Nawrocki, S., Mita, A., Coffey, M., Giles, F.J., Mita, M., 2009. Reovirus-based therapy for cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy* 9, 817–830.
- 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.
- Kim, M., Garant, K.A., Nieden, N.I.Z., Alain, T., Loken, S.D., Urbanski, S.J., Forsyth, P.A., Rancourt, D.E., Lee, P.W.K., Johnston, R.N., 2010. Attenuated reovirus displays oncolysis with reduced host toxicity. *British Journal of Cancer* 104, 290–299.
- Kohl, C., Lesnik, R., Brinkmann, A., Ebinger, A., Radonić, A., Nitsche, A., Mühldorfer, K., Wibbelt, G., Kurth, A., 2012. Isolation and characterization of three mammalian orthoreoviruses from European bats. *Public Library of Sciences ONE* 7, e43106.
- Krähling, V., Dolnik, O., Kolesnikova, L., Schmidt-Chanasit, J., Jordan, I., Sandig, V., Günther, S., Becher, S., 2010. Establishment of fruit bat cells (*Rousettus aegyptiacus*) as a model system for the investigation of filoviral infection. *Public Library of Science Neglected Tropical Diseases* 4, e802.
- Lelli, D., Moreno, A., Lavazza, A., Bresaola, M., Canelli, E., Boniotti, M.B., Cordioli, P., 2012. Identification of mammalian orthoreovirus type 3 in Italian bats. *Zoonoses and Public Health* 60, 84–92.

- Mainou, B.A., Dermody, T.S., 2012. Transport to late endosomes is required for efficient reovirus infection. *Journal of Virology* 86, 8346–8358.
- Marcato, P., Shmulevitz, M., Pan, D., Stoltz, D., Lee, P.W., 2007. Ras transformation mediates reovirus oncolysis by enhancing virus uncoating, particle infectivity, and apoptosis-dependent release. *Molecular Therapy* 15, 1522–1530.
- Meng, S., Jiang, K., Zhang, X., Zhang, M., Zhou, Z., Hu, M., Yang, R., Sun, C., Wu, Y., 2012. Avian reovirus triggers autophagy in primary chicken fibroblast cells and Vero cells to promote virus production. *Archives of Virology* 157, 661–668.
- Montgomery, L.B., Kao, C.Y., Verdin, E., Cahill, C., Maratos-Flier, E., 1991. Infection of a polarized epithelial cell line with wild-type reovirus leads to virus persistence and altered cellular function. *Journal of General Virology* 72, 2939–2946.
- Norman, K.L., Hirasawa, K., Yang, A.-D., Shields, M.A., Lee, P.W.K., 2004. Reovirus oncolysis: the Ras/RalGEF/p38 pathway dictates host cell permissiveness to reovirus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 11099–11104.
- Ooms, L.S., Kobayashi, T., Dermody, T.S., Chappell, J.D., 2010. A post-entry step in the mammalian orthoreovirus replication cycle is a determinant of cell tropism. *Journal of Biological Chemistry* 285, 41604–41613.
- Papenfuss, A.T., Baker, M.L., Feng, Z.-P., Tachedjian, M., Cramer, G., Cowled, C., Ng, J., Janardhana, V., Field, H.E., Wang, L.-F., 2012. The immune gene repertoire of an important viral reservoir, the Australian black flying fox. *BMC Genomics* 13, 261.
- Patrick, M., Norman, K., Lee, P., 2005. Reovirus as an oncolytic agent, in: Curiel, D.T., Douglas, J.T. (Eds.), *Cancer Gene Therapy*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 249–260.

- Pritchard, L.I., Chua, K.B., Cummins, D., Hyatt, A., Crameri, G., Eaton, B.T., Wang, L.F., 2006. Pulau virus: a new member of the Nelson Bay orthoreovirus species isolated from fruit bats in Malaysia. *Archives of Virology* 151, 229–239.
- Rudd, P., Lemay, G., 2005. Correlation between interferon sensitivity of reovirus isolates and ability to discriminate between normal and Ras-transformed cells. *Journal of General Virology* 86, 1489–1497.
- Shmulevitz, M., Pan, L.-Z., Garant, K., Pan, D., Lee, P.W.K., 2010. Oncogenic Ras promotes reovirus spread by suppressing IFN- β production through negative regulation of RIG-I signaling. *Cancer Research* 70, 4912–4921.
- Smakman, N., van den Wollenberg, D.J.M., Borel Rinkes, I.H.M., Hoeben, R.C., Kranenburg, O., 2005. Sensitization to apoptosis underlies KrasD12-dependent oncolysis of murine C26 colorectal carcinoma cells by reovirus T3D. *Journal of Virology* 79, 14981–14985.
- Stewart, W.E., Scott, W.D., Sulkin, S.E., 1969. Relative sensitivities of viruses to different species of interferon. *Journal of Virology* 4, 147–153.
- Strong, J.E., Lee, P.W., 1996. The v-erbB oncogene confers enhanced cellular susceptibility to reovirus infection. *Journal of Virology* 70, 612–616.
- 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. *The EMBO Journal* 17, 3351–3362.
- Strong, J.E., Wong, G., Jones, S.E., Grolla, A., Theriault, S., Kobinger, G.P., Feldmann, H., 2008. Stimulation of Ebola virus production from persistent infection through activation of the Ras/MAPK pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 17982–17987.
- Swift, S., Lorens, J., Achacoso, P., Nolan, G.P., 2001. Rapid production of retroviruses for efficient gene delivery to mammalian cells using 293T cell-based systems. *Current Protocols in Immunology* 31, 10.17.14–10.17.29.

- Taber, R., Alexander, V., Whitford, W., 1976. Persistent reovirus infection of CHO cells resulting in virus resistance. *Journal of Virology* 17, 513–524.
- Thalmann, C.M., Cummins, D.M., Yu, M., Lunt, R., Pritchard, L.I., Hansson, E., Cramer, S., Hyatt, A., Wang, L.-F., 2010. Broome virus, a new fusogenic Orthoreovirus species isolated from an Australian fruit bat. *Virology* 402, 26–40.
- Verdin, E.M., Maratos-Flier, E., Carpentier, J.L., Kahn, C.R., 1986. Persistent infection with a nontransforming RNA virus leads to impaired growth factor receptors and response. *Journal of Cellular Physiology* 128, 457–465.
- 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. *Journal of Virology* 65, 6772–6781.
- Wang, L.-F., 2011. Discovering novel zoonotic viruses. *New South Wales Public Health Bulletin* 22, 113-117.
- Wang, L.-F., Walker, P.J., Poon, L.L.M. 2011. Mass extinctions, biodiversity and mitochondrial function: are bats “special” as reservoirs for emerging viruses? *Current Opinion in Virology* 1, 649–657.
- Wetzel, J.D., Chappell, J.D., Fogo, A.B., Dermody, T.S., 1997a. Efficiency of viral entry determines the capacity of murine erythroleukemia cells to support persistent infections by mammalian reoviruses. *Journal of Virology* 71, 299–306.
- Wetzel, J.D., Wilson, G.J., Baer, G.S., Dunnigan, L.R., Wright, J.P., Tang, D.S., Dermody, T.S., 1997b. Reovirus variants selected during persistent infections of L cells contain mutations in the viral S1 and S4 genes and are altered in viral disassembly. *Journal of Virology* 71, 1362–1369.
- Wong, S., Lau, S., Woo, P., Yuen, K.-Y., 2007. Bats as a continuing source of emerging infections in humans. *Reviews in Medical Virology* 17, 67–91.

xxx

Wong, A.H., Cheng, P.K.C., Lai, M.Y.Y., Leung, P.C.K., Wong, K.K.Y., Lee, W.Y., Lim, W.W.L., 2012. Virulence potential of fusogenic orthoreoviruses. *Emerging Infectious Diseases* 18, 944–948.

Zhou, P., Cowled, C., Todd, S., Crameri, G., Virtue, E.R., Marsh, G.A., Klein, R., Shi, Z., Wang, L.F., Baker, M.L., 2011. Type III IFNs in pteropid bats: differential expression patterns provide evidence for distinct roles in antiviral immunity. *Journal of Immunology* 186, 3138–3147.

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

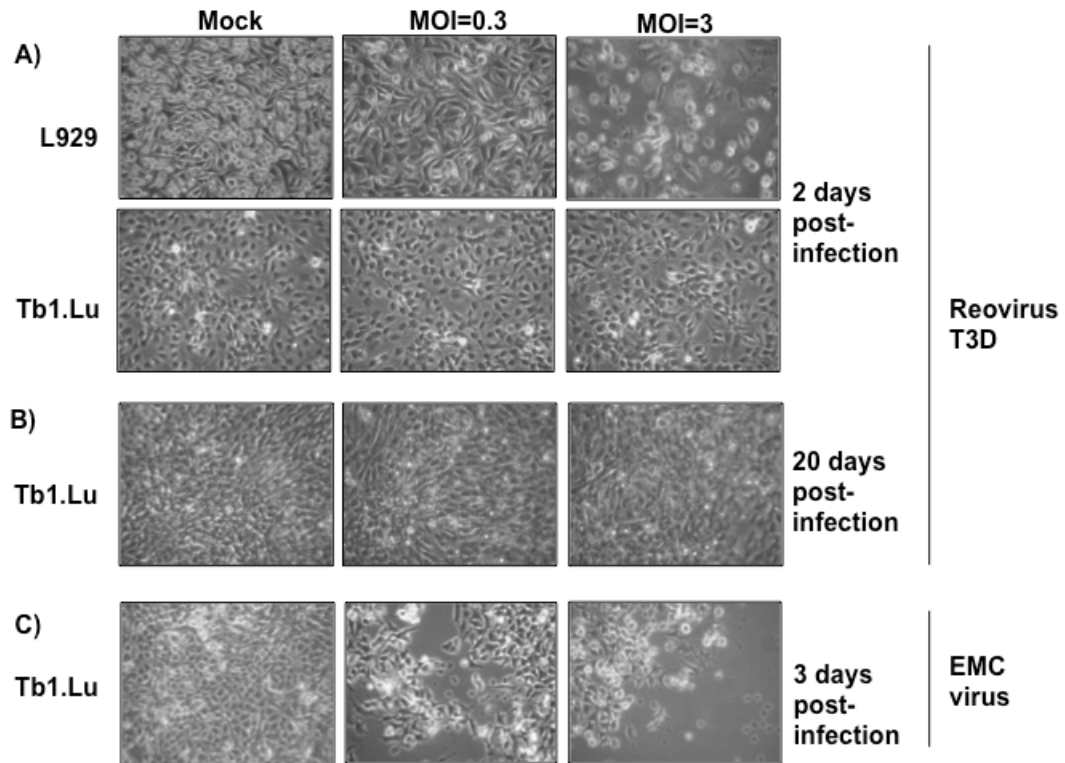


Fig. 1. Tb1.Lu cells are resistant to reovirus-induced cell lysis.

(A) L929 cells and Tb1.Lu cells were infected with reovirus serotype 3 Dearing at the indicated multiplicity of infection (MOI) and cells were examined by phase-contrast microscopy 2 days post-infection. (B) Tb1.Lu cells were infected as in panel A and examined 20 days post-infection without cell passage. (C) Tb1.Lu cells were infected with EMC virus at the indicated MOI and cells were examined 3 days post-infection.

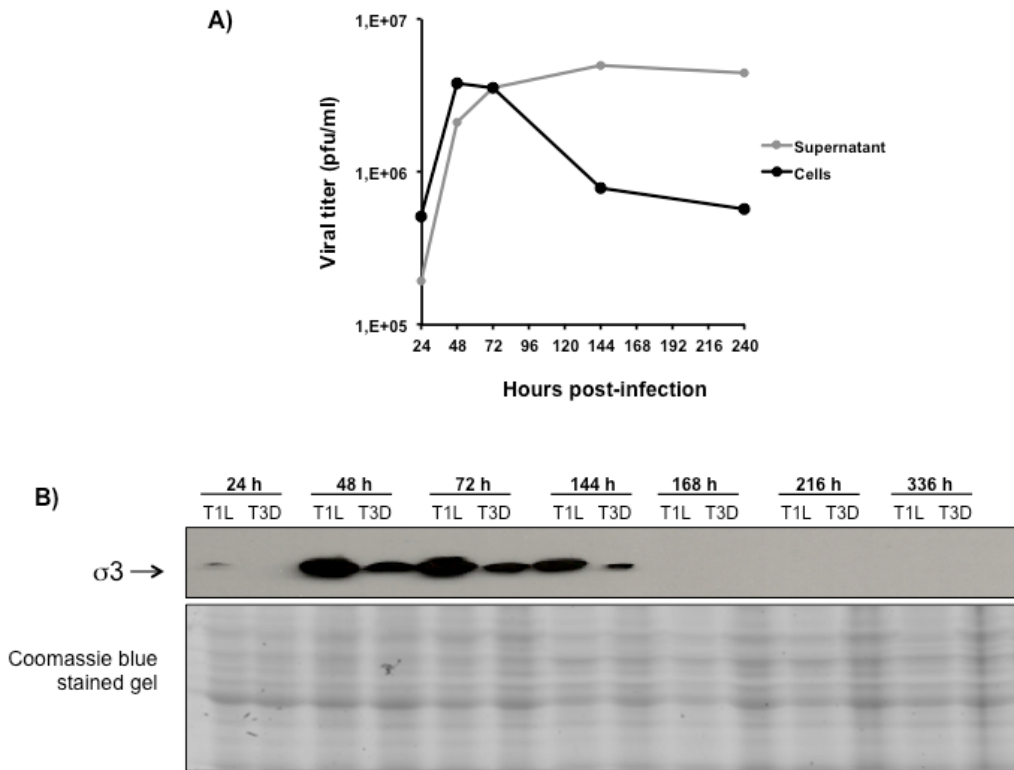


Fig. 2. Reovirus replication kinetics in Tb1.Lu cells.

(A) Wild-type T3D virus was used to infect Tb1.Lu cell at an MOI of 5. Cells were recovered separately from their supernatant at indicated times post-infection without cell passage or change of media. Plaque assay was used for virus titration, as described in Section 2. (B) Laboratory stocks of T1L and T3D were used to infect Tb1.Lu cell at an MOI of 5. Cells were passaged 72 h and 240 h post-infection. Fresh medium was added at 144 hours post-infection. Proteins were recovered at various times post-infection as indicated and analyzed for the presence of viral proteins by immunoblotting, as described in Section 2; position of the major outer capsid protein $\sigma 3$ is indicated.

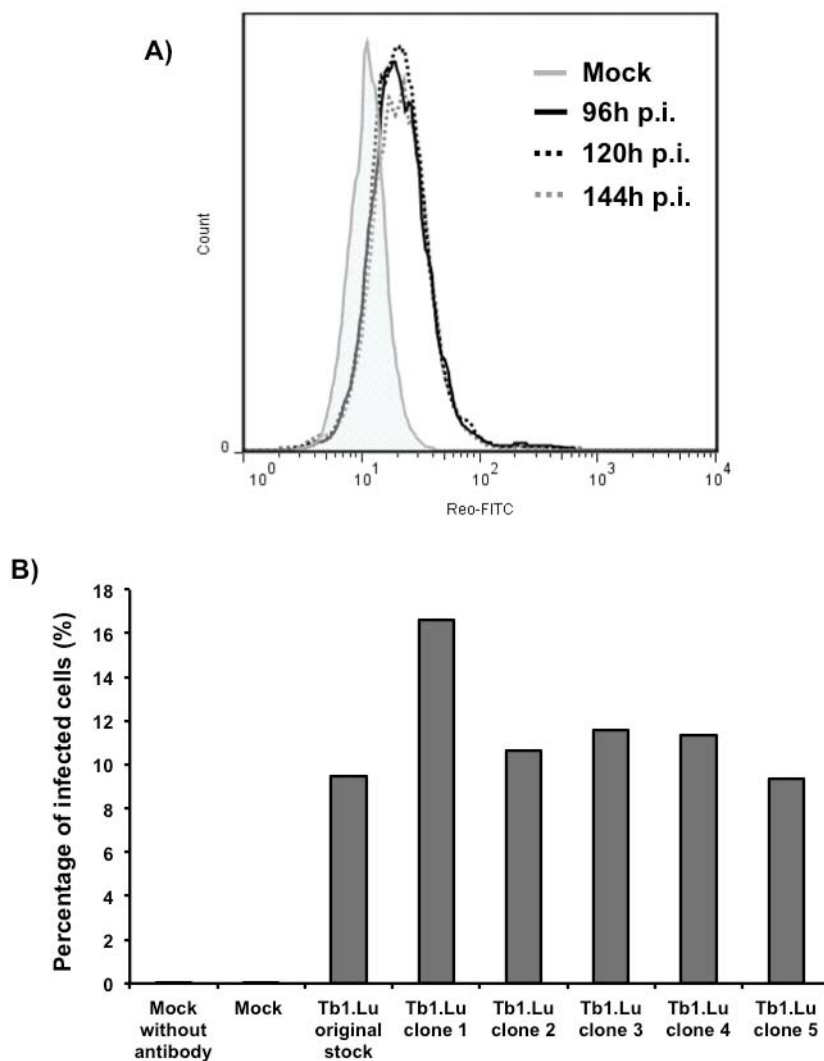


Fig. 3. Percentage of Tb1.Lu infected cells by reovirus T3D measured by FACS analysis. (A) Tb1.Lu cells were infected at a MOI of 5 and intracellular reovirus antigens were detected by FACS analysis at different times post-infections, as described in materials and methods. (B) Different cell clones, isolated as described in Section 2, or the original cell population, were infected at a MOI of 5 and analyzed 72 h post-infection, the percentage of positive cells detected by FACS analysis is presented.

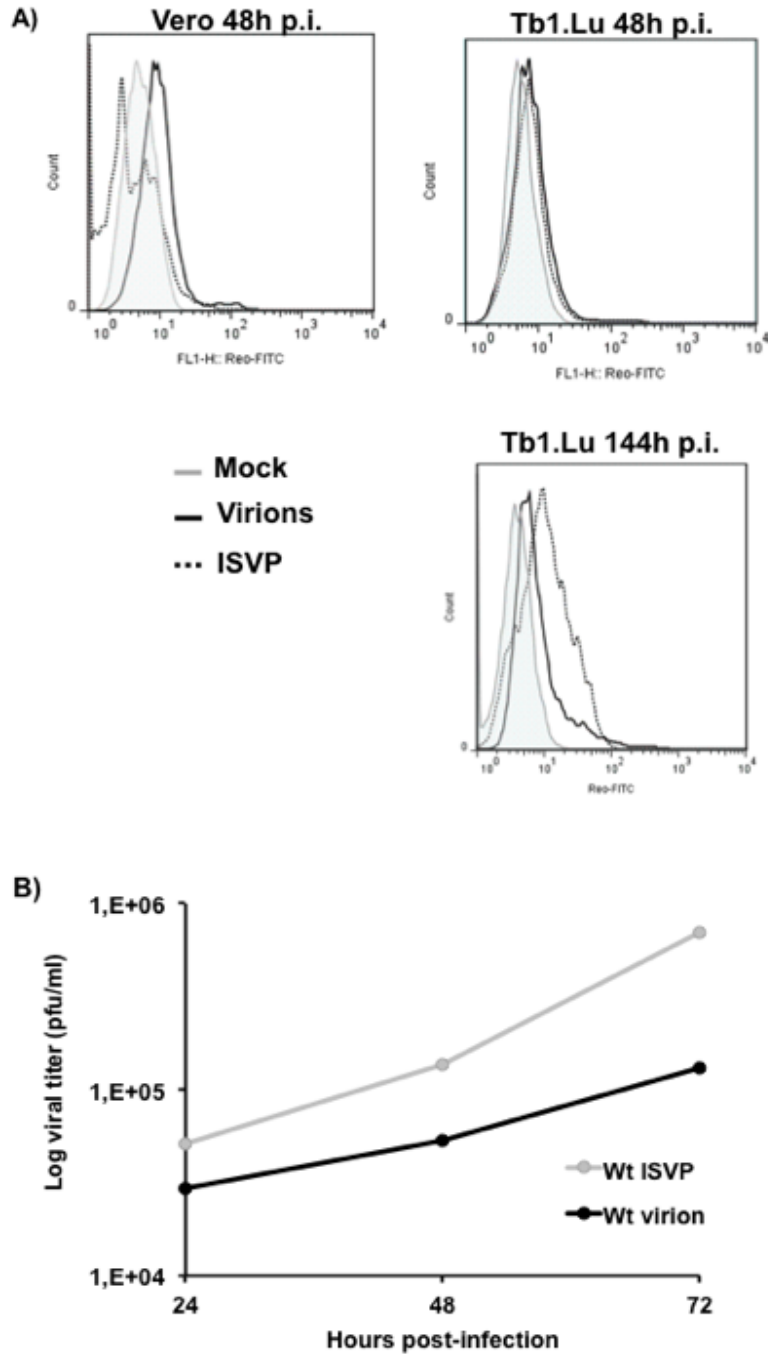


Fig. 4. Infection of Tb1.Lu cells by virions or ISVPs.

(A) Tb1.Lu cells were infected at an MOI of 3 with either virions or ISVPs and recovered 144 h post-infection for FACS analysis. (B) Tb1.Lu cells infected with either virions or ISVPs were recovered at different times post-infection, subjected to three cycles of freeze–thaw and total infectious virus titered, as described in Section 2.

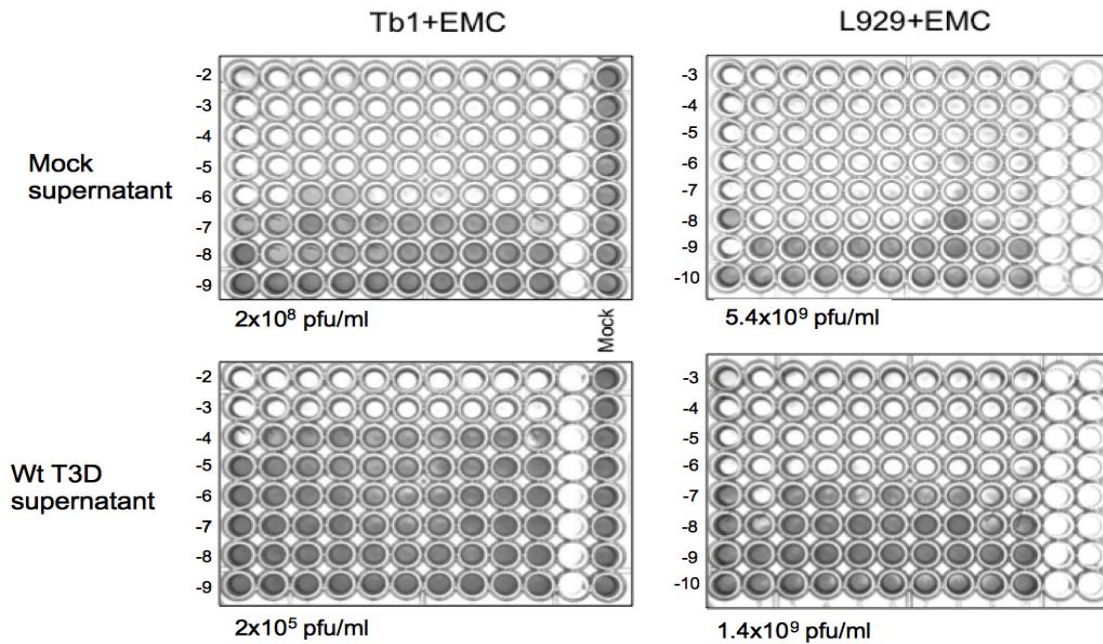


Fig. 5. Secretion of an antiviral factor by reovirus-infected Tb1.Lu cells.

Tb1.Lu or L929 cells were infected at a MOI of 5 for 12 h and cell supernatant collected and UV-irradiated to remove infectious reovirus. Uninfected Tb1.Lu or L929 cells in 96-wells microplates were used for TCID₅₀ titration of encephalomyocarditis virus using serial tenfold dilution of the EMC virus stock, as indicated. Supernatant of either mock-infected or reovirus-infected cells were added after the EMC adsorption period, as described in Section 2, and kept for the whole incubation period. Cells were fixed 3 days post-infection and stained with methylene blue, as described in Section 2.

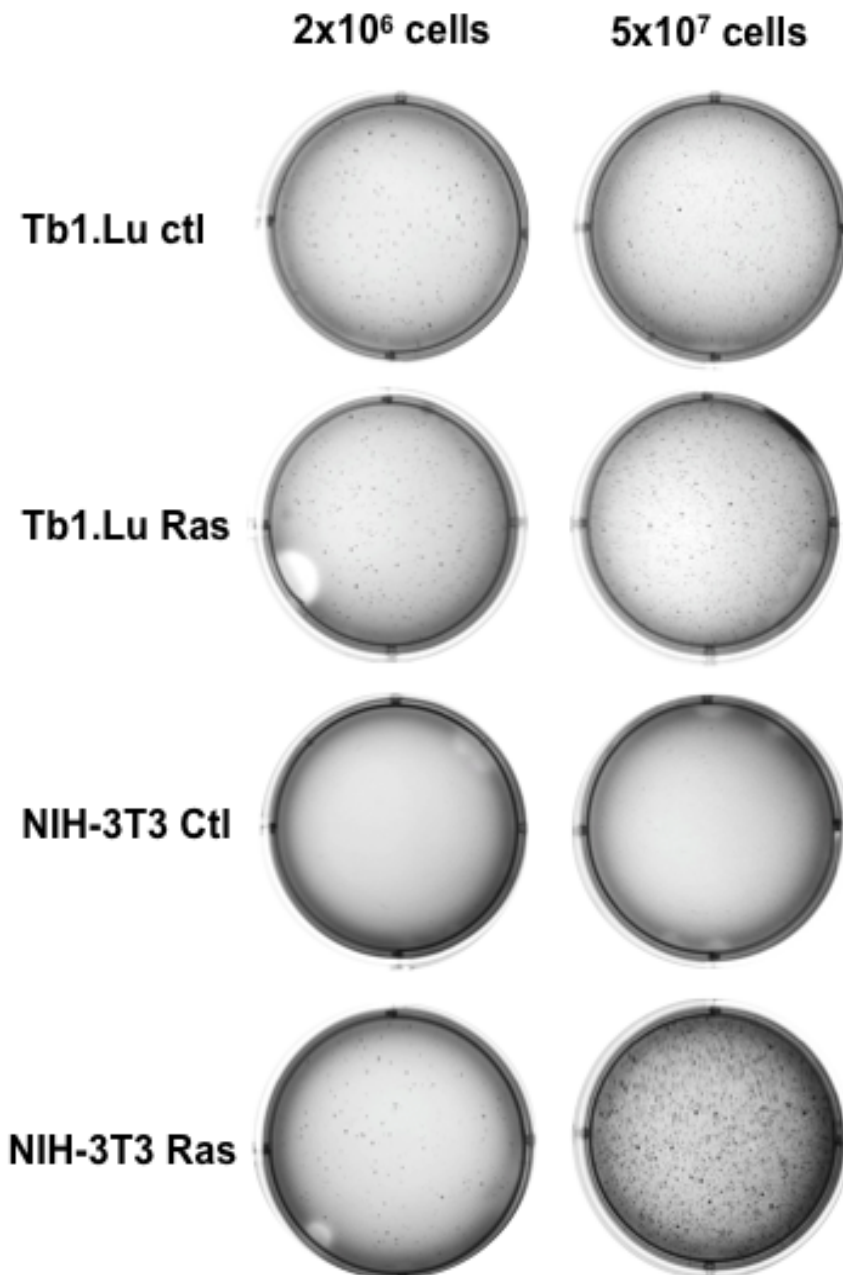


Fig. 6. Cell transformation status of control and Ras-transduced Tb1.Lu cells.

Tb1.Lu cells and control NIH-3T3 cells were transduced with a retroviral vector encoding constitutively active H-Ras^{V12} or a control empty vector. Stably transduced cells were then plated in 0.4% agar medium at two different cell concentrations, as indicated, and colonies that developed after 2 weeks were stained with crystal violet, as described in Section 2.

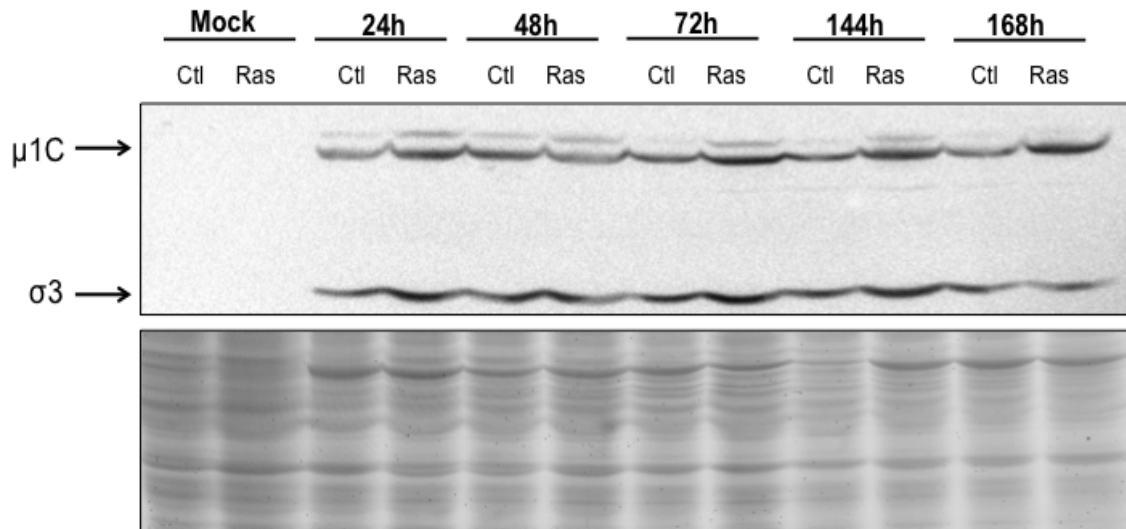


Fig. 7. Effect of transforming Ras on reovirus infection in Tb1.Lu cells.

Tb1.Lu ctl and Tb1.Lu Ras cells were infected at a MOI of 5; cellular proteins were recovered at different times post-infections and analyzed by immunoblotting. Positions of major viral capsid proteins $\sigma 3$ and $\mu 1C$ are indicated.

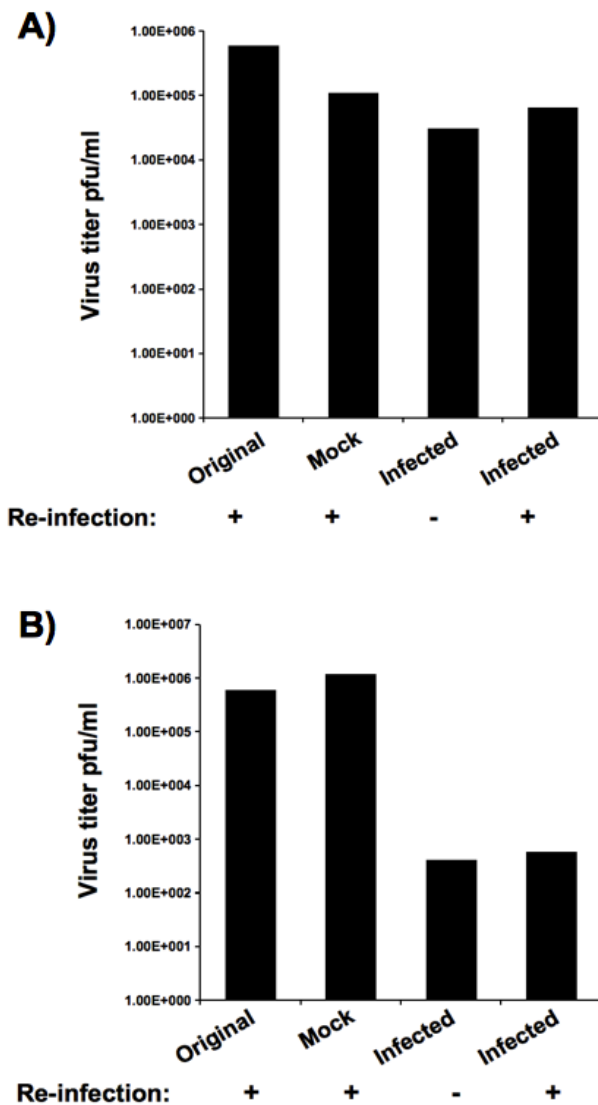


Fig. 8. Long-term reovirus infection of Tb1.Lu cells.

Cells were infected or mock-infected and kept for 1 month either by changing the medium twice a week (A) or by cell passage at the same cell density twice a week (B). At this point, mock-infected or infected cell stocks were seeded in parallel with the original parental cell stock at the same cell density and infected with wild type reovirus at a MOI of 5 or left uninfected, as indicated. Virus inoculum was removed following virus adsorption, cells were recovered 72 h post-infection and subjected to three cycles of freeze–thaw before virus titration.

Annexe 2: Article de vulgarisation

Un article de vulgarisation intitulé « **Des virus devenus des super-héros contre le cancer?** » a été publié dans le Magazine Facteur Santé en février 2014. (Sandekian and Lemay, 2014).

Dans cet article, nous survolons les différents concepts reliés à l'activité de quelques virus oncolytiques principaux. Nous discutons également des avantages et des obstacles de ce type de thérapie. Nous discutons également brièvement des nouvelles approches prometteuses pour optimiser l'activité oncolytique de certains virus.

Contribution des auteurs :

L'article a été écrit en majeure partie par moi-même sous la vérification du Dr Guy Lemay. J'ai contribué à la création de figures et ainsi qu'à la révision du manuscrit.

Des virus devenus des super-héros contre le cancer?

Véronique Sandekian et Guy Lemay

Les dernières statistiques canadiennes sur le cancer indiquent que 2 Canadiens sur 5 seront atteints de cette maladie au cours de leur vie et que 1 sur 4 en mourra; il s'agit d'ailleurs de la principale cause de décès au pays. Plusieurs stratégies sont utilisées pour combattre ce fléau, mais leur efficacité n'est malheureusement pas toujours optimale. De nouveaux traitements prometteurs et innovateurs utilisant des virus, surnommés « oncolytiques », font actuellement l'objet de nombreuses études. Ces virus seraient-ils les superhéros tant attendus pour vaincre le cancer?

Les super-héros sont omniprésents dans le monde du divertissement ces dernières années. Que ce soit dans les films à gros budgets d'Hollywood, dans les bandes dessinées, dans les jeux vidéo, ils sont partout! On va même jusqu'à combiner certains personnages de différentes séries afin d'accroître l'engouement du spectateur et bien sûr, les recettes au box-office! Certains personnages plutôt considérés comme vilains dans une série peuvent se retrouver du côté des gentils dans l'autre. Ça pourrait vous paraître étrange, mais les « vilains virus » eux aussi peuvent, dans certaines circonstances, devenir des super-héros. En effet, certains virus dits « oncolytiques » sont actuellement à l'essai pour traiter divers types de cancers et affichent des résultats très prometteurs.

L'idée peut, a priori, sembler saugrenue. Habituellement, quand on parle de virus ce n'est pas très positif. On les rangerait sans hésiter du côté des vilains et non des super-héros! Dans les manchettes, on les associe à des maladies graves, des maladies qui peuvent difficilement être contrôlées; on pense immédiatement à la grippe (virus Influenza) ou au SIDA (virus de l'immunodéficience humaine, VIH). Pourquoi alors envisager les virus comme des super-héros pour traiter d'autres maladies? Les virologistes vous diront premièrement que ce ne sont pas tous les virus qui causent des maladies. Souvent, l'infection passe inaperçue et sans symptômes graves. De plus, avec les progrès de la recherche en génie génétique, les scientifiques peuvent désormais modifier certains virus afin d'assurer leur application sécuritaire.

Tout d'abord, qu'est-ce qu'un virus? Les virus sont généralement bâtis de manière très simple : quelques protéines ainsi que leur génome (ensemble de leurs gènes). C'est la raison pour laquelle ils ont besoin d'infecter une cellule de notre organisme et de l'utiliser à leur avantage afin d'assurer leur propre reproduction. Ils détruisent ensuite la cellule infectée en relâchant les virus nouvellement formés qui iront à leur tour infecter d'autres cellules et ainsi de suite. On qualifie donc les virus de parasites cellulaires. Malgré le fait qu'ils soient à la frontière entre le vivant et l'inerte, les virus ont toutefois au moins un point en commun avec tous les êtres vivants : ils veulent à tout prix assurer la survie de leur espèce (évidemment sans en avoir conscience); bref, ils doivent se reproduire.

Une cellule cancéreuse n'est guère différente sur ce dernier point. C'est une cellule normale de notre organisme, mais qui a acquis des mutations et perdu ainsi le contrôle de sa multiplication. En d'autres termes, ces cellules peuvent être vues comme obsédées (au sens figuré, bien sûr) par leur prolifération anarchique, si bien qu'elles laissent de côté leur système de défense contre de simples infections. Sachant cela, il est logique de penser qu'une tumeur puisse être plus susceptible d'être attaquée par les virus. L'administration d'un virus au sein de la tumeur cancéreuse serait en quelque sorte un traitement se renouvelant par lui-même, les virus se reproduisant au sein de la tumeur tout en la détruisant progressivement! Étonnamment, l'idée n'est pas nouvelle et les premiers cas rapportés de rémission temporaire de cancers à la suite d'une infection virale remontent à 1904. Une patiente atteinte d'une grippe a vu sa leucémie régresser pendant l'infection. Un autre exemple est le cas, décrit en 1910, d'une patiente vaccinée contre le virus de la rage, qui a vu son cancer utérin reculer. L'idée d'utiliser directement des virus pour le traitement du cancer n'a toutefois pas eu de suite concrète, étant donné les problèmes de sécurité entourant à l'époque l'administration de virus chez l'humain.

Aujourd'hui, tout porte à croire que les virus oncolytiques pourraient se rajouter prochainement à l'arsenal thérapeutique anticancéreux. De petits groupes de patients volontaires ont déjà reçu différents virus inoffensifs, atténués, ou modifiés génétiquement. En 2006, les autorités chinoises approuvaient d'ailleurs un premier virus oncolytique pour le traitement de cancers de la tête et du cou. Il s'agit d'une version modifiée de

l'adénovirus, virus causant normalement des infections oculaires, respiratoires et gastro-intestinales. La situation est évidemment différente en Occident où les organismes de contrôle apparaissent beaucoup plus stricts avant d'autoriser de nouveaux médicaments; tous les espoirs pour l'avenir sont toutefois permis avec l'accumulation de données positives lors de multiples essais cliniques.

Une panoplie de héros pour une panoplie de cancers.

La liste de virus oncolytiques à l'étude s'allonge en fait constamment. Dans plusieurs cas, les essais cliniques de phase 1, visant à établir l'innocuité de l'administration de ces virus, sont complétés. Les conclusions sont claires, il y a peu ou pas d'effets secondaires observables : parfois, une fièvre, une diarrhée, mais rien de sévère. Dans cette panoplie de virus, nous allons maintenant en examiner quelques-uns parmi ceux qui soulèvent le plus d'espoir.

Le virus de la vaccine a longtemps été utilisé comme vaccin contre la variole, maladie aujourd'hui disparue. Ainsi, tous les Québécois nés avant 1971 portent une cicatrice caractéristique, résultat de la technique de scarification lors de l'inoculation. Afin de transformer ce virus en agent oncolytique, il est possible de lui enlever un gène normalement nécessaire à la synthèse de son génome. Le virus se trouve ainsi confiné aux cellules qui possèdent une quantité anormalement élevée d'éléments nécessaires à la synthèse du génome cellulaire : donc les cellules cancéreuses en prolifération rapide. Ce virus est actuellement à l'étude pour de petits groupes de patients atteints du cancer du foie et du cancer colorectal, notamment. Pour l'adénovirus, les chercheurs sont parvenus à éliminer un gène du virus afin de permettre sa reproduction uniquement chez les cellules ayant un défaut dans une protéine appelée p53, défectueuse chez les cellules de nombreux types de tumeurs. L'adénovirus demeure donc l'un des virus oncolytiques les plus largement étudiés en clinique et comme il a été mentionné, le seul à avoir été approuvé comme traitement jusqu'à maintenant.

L'un des rares virus oncolytiques ayant naturellement des pouvoirs anticancéreux, contrairement aux deux exemples précédents qui ont trouvé leur origine dans des

laboratoires, est le réovirus. Ce virus, nommé ainsi pour « Respiratory Enteric Orphan virus » est, comme son nom l'indique, responsable d'infections respiratoires et entériques. Aucune maladie n'y est vraisemblablement associée d'où l'appellation « orphelin », en quelque sorte le Batman des virus oncolytiques. Ce virus est actuellement l'objet d'essais cliniques contre plusieurs types de cancers (poumon, sein, ovaire, prostate, colon, pancréas, etc.). Ce virus s'avère particulièrement intéressant puisqu'il est naturellement sensible à l'interféron, une molécule importante du système immunitaire produite par les cellules normales, mais dont la production est fortement réduite ou absente chez beaucoup de cellules cancéreuses. Le réovirus est donc bloqué dans les cellules normales, mais peut prendre le contrôle des cellules cancéreuses et les détruire. Le fait que les cellules cancéreuses induisent un microenvironnement acide et riche en enzymes facilite aussi sans doute l'infection puisque l'une des étapes limitantes de l'infection nécessite justement ces enzymes et un pH acide. Récemment, un groupe de chercheurs a mis au point une technique pour modifier génétiquement le réovirus. Cette avancée est une percée importante dans le domaine, puisqu'elle devrait permettre de mieux étudier ce virus en vue d'optimiser son potentiel oncolytique.

Les scientifiques sont donc de plus en plus convaincus de la possibilité d'une utilisation sécuritaire des virus pour combattre le cancer. Cependant, le problème qui est de plus en plus soulevé est plutôt l'efficacité réelle du traitement. En effet, plusieurs obstacles se trouvent sur le chemin de nos super-héros. Sont-ils assez forts pour gagner contre le cancer?

Acquisitions de nouveaux pouvoirs

Néanmoins, ce n'est pas peine perdue : les virus peuvent acquérir d'autres pouvoirs! Avec les avancées en virologie, en immunologie, en génie génétique et en cancérologie il est possible d'ajouter ou d'enlever certaines composantes des virus afin de leur permettre d'atteindre plus rapidement ou directement les tumeurs ou d'accroître leur force destructrice. Plusieurs nouvelles stratégies font leur apparition dans le domaine. C'est la raison pour laquelle un congrès scientifique international à ce sujet est organisé

tous les deux ans, le dernier en date a eu lieu à Québec durant l'été 2013. Lors de ce rassemblement, les chercheurs de partout dans le monde peuvent ainsi rassembler leurs idées, partager leurs derniers résultats et discuter des progrès et des obstacles que ces études soulèvent.

Par exemple, il est connu depuis un certain temps que les cellules tumorales arrivent à créer un microenvironnement caractéristique autour d'elles. Ce faisant, le cancer se développe en cachette sans que les cellules de défense immunitaire qui parcourent notre corps en soient informées. Sachant cela, certains ont eu la brillante idée de greffer des molécules qui stimulent le système immunitaire aux virus oncolytiques. Ce faisant, en plus de cibler et tuer les cellules cancéreuses, nos super-héros sonnent l'alarme au système de défense de notre organisme afin qu'il contribue lui aussi à l'élimination de la tumeur. C'est le cas de certaines versions modifiées du virus de la vaccine, de l'adénovirus et du virus de l'herpès, entre autres. Cependant, le système immunitaire peut aussi neutraliser certains virus qui peuvent ainsi n'avoir même pas la chance de se rendre au terrain de combat. C'est pourquoi certaines études ont associé le réovirus à des cellules du système immunitaire de type « porteuses ». Ce faisant, les virus sont transportés incognito jusqu'à la tumeur, sans que le système immunitaire responsable de la destruction des virus en soit informé. Ce serait un peu la « batmobile » du réovirus! Des stratégies visant à pourvoir d'autres virus oncolytiques de divers boucliers contre le système immunitaire sont aussi envisagées.

On peut également armer les virus oncolytiques avec des molécules toxiques spécifiques envers les cellules cancéreuses ou avec des composantes qui augmentent l'effet d'autres thérapies (chimiothérapie et radiothérapie) ou encore rajouter des éléments clés présents chez d'autres virus oncolytiques. Par analogie, on pourrait parler de partage de pouvoirs entre nos super-héros.

Avantages de l'utilisation de virus et perspectives d'avenir

Les virus oncolytiques, formant une classe unique de médicaments par leur capacité de se reproduire tout comme les cellules cancéreuses qu'ils attaquent, pourraient

présenter de nombreux avantages dans le traitement des cancers les plus récalcitrants. Pensons aux patients qui sont atteints d'un type de cancer résistant à la chimiothérapie ou à la radiothérapie. L'administration de virus oncolytiques pourrait contribuer à affaiblir la tumeur et ainsi la rendre plus susceptible aux thérapies conventionnelles. C'est d'ailleurs ce qui a été remarqué dans plusieurs essais cliniques. Comme dans les films d'Hollywood, on peut combiner les super-héros en une escouade d'élite, pour ainsi atteindre un effet plus spectaculaire! Il est aussi reconnu que les premières cellules qui sont à l'origine d'une tumeur, nommées « cellules souches cancéreuses », sont souvent résistantes à la chimiothérapie et à la radiothérapie. Par contre, elles semblent être sensibles aux virus oncolytiques.

Il semble de plus en plus évident qu'il n'y aura pas un seul super-héros capable de détruire tous les types de cancer. Plusieurs de ces virus ont une activité plus ou moins limitée à un type de cancer en particulier. Considérant toutes les possibilités de combinaisons de virus et de thérapies plus conventionnelles, il est évident que beaucoup de recherches restent à venir. Malgré tout, de plus larges essais cliniques dits de phase 3 sont en cours; ces études visent à établir la réelle efficacité des traitements utilisant des virus seuls ou en combinaison avec des thérapies plus conventionnelles. Les experts sont généralement d'accord pour prédire que dans quelques années, le premier virus oncolytique devrait être approuvé aux États-Unis et au Canada.

Les super-héros arrivent à la rescousse!

Véronique Sandekian détient un baccalauréat en sciences biologiques (option « honor » en microbiologie et immunologie) de l'Université de Montréal. Elle poursuit depuis 2009 des travaux de recherche au sein de l'équipe du Dr Guy Lemay au département de Microbiologie, infectiologie et immunologie, en vue de l'obtention du doctorat en Virologie et immunologie.

Guy Lemay est détenteur d'une maîtrise en microbiologie et immunologie de l'Université de Montréal et d'un doctorat en biochimie de l'Université McGill. Professeur au département de microbiologie, infectiologie et immunologie de l'Université de Montréal depuis 1989, il partage son temps entre l'enseignement et la recherche en virologie. Ses travaux portent entre autres sur une meilleure compréhension de la reproduction du réovirus au sein des cellules cancéreuses.

Figures

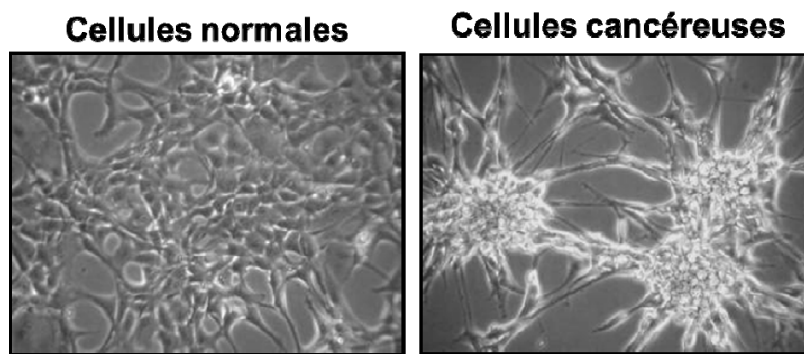


Fig. 1. Cellules normales et cellules cancéreuses.

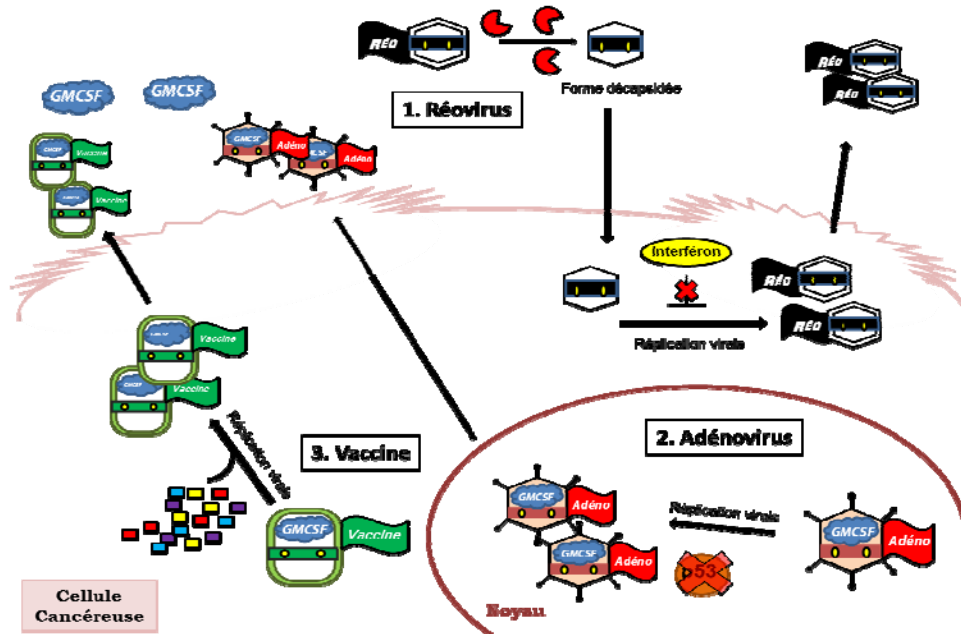


Fig. 2. Exemples de stratégies de réplication de certains virus oncolytiques.

1. Réovirus élimine sa capside externe grâce au pH acide et aux enzymes présentes dans l'environnement extracellulaire de plusieurs cellules cancéreuses. Le virus peut ensuite entrer à l'intérieur de la cellule. La réplication virale est possible puisque le facteur antiviral, nommé interféron, est absent ou diminué chez les cellules cancéreuses. De nouveaux reovirus parviennent ensuite à détruire la cellule infectée et pourront répéter le processus d'infection afin de détruire les cellules cancéreuses avoisinantes. **2. Adénovirus** est manipulé génétiquement pour se répliquer spécifiquement chez les cellules faiblement productrices de la protéine p53. Ce faisant, la réplication est confinée aux cellules cancéreuses. Les virus produits, en détruisant la cellule cancéreuse, peuvent également libérer le facteur GMCSF (introduits chez certains adénovirus oncolytiques) qui ira sonner l'alarme pour recruter le système immunitaire au site de la tumeur. **3. Le virus de la vaccine** est manipulé génétiquement et se reproduit spécifiquement dans les cellules ayant une forte production d'éléments nécessaires à la réplication de son génome. Les cellules en prolifération rapide, comme les cellules cancéreuses, sont donc plus facilement infectables, et tout comme l'exemple précédent, l'ajout de GMCSF au sein de ce virus permet de recruter le système immunitaire lorsque cet élément est relâché au moment de la destruction de la cellule cancéreuse par les virus nouvellement produits.

**Réovirus au microscope
électronique**

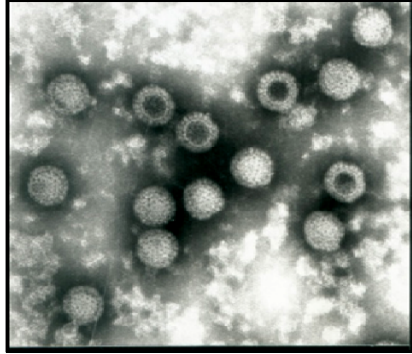


Fig. 3. Réovirus au microscope électronique.

Annexe 3: Dépôt de séquences dans GenBank

Dans l'article présenté à la section 5.3 « **A single amino acid substitution in the mRNA capping enzyme lambda2 is responsible for interferon sensitivity in mammalian orthoreovirus** » nous avons mentionné que nous avons séquencé tous les gènes de nos virus T3D^S et P4L-12.

Numéros d'accèsion dans GenBank (disponible prochainement) :

KP208804 à KP208813 pour T3D^S

KP208814 à KP208823 pour P4L-12

Contribution des auteurs :

J'ai extrait, séquencé et analysé tous les gènes du T3D^S et 8 des 10 gènes du P4L-12, les deux autres (S4 et M2) avaient déjà été séquencés auparavant. J'ai déposé le tout dans la banque de données GenBank via BankIt.