

Université de Montréal

# **Étude de la protéine sigma 1 de réovirus par génétique inverse**

par

Virginie Brochu-Lafontaine

Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise ès sciences  
en microbiologie et immunologie

Date de remise

30 avril 2012

© Virginie Brochu-Lafontaine, 2012

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Étude de la protéine  $\sigma 1$  de réovirus par génétique inverse

Présenté par :

Virginie Brochu-Lafontaine

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Hugo Soudeyns, président-rapporteur

Dr Guy Lemay, directeur de recherche

Dr Patrick Labonté (Institut Armand-Frappier), membre du jury

## Résumé

Réovirus, connu sous le nom REOLYSIN®, est présentement à l'étude à titre d'agent oncolytique. Or, la spécificité du virus pour les cellules cancéreuses pourrait être optimisée par une modification au niveau de la protéine d'attachement  $\sigma 1$ . La présente étude vise à démontrer qu'une telle amélioration est possible par l'utilisation de la méthode nouvellement décrite de génétique inverse. Par cette technique, il est possible d'ajouter un polypeptide d'une longueur de quarante acides aminés à l'extrémité C-terminale de  $\sigma 1$ . Il est aussi possible d'engendrer des virus mutés en leur site d'activité mucinolytique. Les virus nouvellement créés démontrent une efficacité de réplication diminuée, mais demeurent infectieux. Contrairement aux méthodes traditionnellement utilisées avec réovirus, la méthode de génétique inverse permet de conserver les mutations engendrées, par substitution ou addition, au cours des cycles de réplication. Une telle étude démontre qu'il serait possible de modifier le tropisme de réovirus.

**Mots-clés** : réovirus, génétique inverse, mucine, tag

## Abstract

Reovirus, also known under the tradename REOLYSIN®, is currently under clinical trial as an oncolytic agent. The specificity of the virus for transformed (cancerous) cells could be improved by modifications of the  $\sigma 1$  attachment protein. This study presents two ways to achieve this improvement by using a newly developed method of reverse genetics for double-stranded RNA viruses. As a proof of concept, we engineered the addition of an exogenous polypeptide of forty amino-acids to the C-terminal end of  $\sigma 1$ . Subsequently, we created viruses with compromised mucinolytic activities by introducing amino-acids substitutions in the appropriate genetic sites. A decreased replicative efficacy was observed in all experimentally generated viruses, despite maintaining their infectious capacity. Reverse genetics allows the generation of viruses that retain their mutations throughout successive replicative cycles, which was impossible with traditional techniques. This project demonstrates the feasibility of tropism modification by using the reverse genetics method.

**Keywords** : reovirus, reverse genetics, mucin, tagging

# Table des matières

<b>1. Revue de littérature.....</b>	<b>12</b>
<b>1.1 Réovirus .....</b>	<b>12</b>
1.1.1 Réovirus chez les Reoviridae .....	12
1.1.2 Épidémiologie et pathogénicité.....	13
1.1.3 Structure et génétique.....	15
1.1.4 Cycle de réplication.....	18
1.1.5 L'attachement du virus, une étape clé .....	20
<b>1.2 La protéine <math>\sigma 1</math>.....</b>	<b>21</b>
1.2.1 La structure.....	21
1.2.2 $\sigma 1$ , la protéine d'attachement.....	21
1.2.3 $\sigma 1$ , une protéine enzymatique .....	23
1.2.4 $\sigma 1$ et la modification du tropisme chez Réovirus et Adénovirus .....	26
<b>1.3 Réovirus T3D, un virus oncolytique .....</b>	<b>28</b>
1.3.1 La découverte .....	28
1.3.2 Le mécanisme oncolytique et ses limites .....	28
<b>1.4 La génétique inverse .....</b>	<b>30</b>
1.4.1 Le concept .....	30
1.4.2 Le mécanisme.....	30
<b>2. Problématique et objectifs du projet.....</b>	<b>33</b>
<b>2.1 Problématique .....</b>	<b>33</b>
<b>2.2 Objectifs du projet .....</b>	<b>33</b>
<b>3. Ajout d'un tag à l'extrémité N-terminale de <math>\sigma 1</math>.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1. Introduction .....</b>	<b>37</b>
<b>3.2. Materials and methods .....</b>	<b>40</b>
3.2.1. Cells and viruses .....	40

3.2.2. Antibodies .....	40
3.2.3. Plasmid constructs.....	41
3.2.4. Recovery of infectious viruses by plasmid-based reverse genetics .....	42
3.2.5. Plaque assay .....	42
3.2.6. Sequencing of S1 viral genome segment .....	43
3.2.7. Immunoblotting.....	44
<b>3.3. Results .....</b>	<b>45</b>
3.3.1 Rationale .....	45
3.3.2. Introduction of an epitope-encoding sequences before the stop codon in the S1 gene .....	46
3.3.3. Sequencing the S1 gene of viral clones harbouring exogenous epitope .....	47
3.3.4. Expression of tagged $\sigma 1$ in infected cells .....	47
3.3.5. Addition of longer peptide sequences at the carboxyl-terminal end of $\sigma 1$ .....	48
3.3.6. Further characterization of tagged viruses .....	48
<b>3.4. Discussion.....</b>	<b>49</b>
<b>3.5 Acknowledgments .....</b>	<b>51</b>
<b>3.6 References .....</b>	<b>51</b>
<b>3.7 Tables and figures .....</b>	<b>57</b>
<b>4. Étude de l'activité mucinolytique par la méthode de génétique inverse .....</b>	<b>62</b>
<b>4.1. La génération des substitutions.....</b>	<b>62</b>
4.1.1 Méthode.....	62
4.1.2 Résultats .....	64
<b>4.2 Génération des virus .....</b>	<b>65</b>
4.2.1 Méthode.....	65
4.2.2 Résultats .....	66
<b>4.3 Caractérisation de l'infection sur cellules L929 .....</b>	<b>68</b>
4.3.1 Méthode.....	68
4.3.2 Résultats .....	68
<b>4.4 Caractérisation de l'infection sur cellules MDCK .....</b>	<b>72</b>

4.4.1 Méthode.....	72
4.4.2 Résultats .....	72
<b>5. Discussion.....</b>	<b>74</b>
<b>5.1 L'ajout d'un tag à la protéine <math>\sigma 1</math> .....</b>	<b>74</b>
5.1.1 En perspective .....	76
<b>5.2 L'activité mucinolytique de réovirus .....</b>	<b>76</b>
5.2.1 La caractérisation des mutants, un projet à suivre... ..	78
<b>5.3 La polyvalence de la génétique inverse .....</b>	<b>80</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>81</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>82</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau I.</b> (Table I de l'article) List of oligonucleotides used as primers in this study.....	57
<b>Tableau II.</b> Amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée, le RT-PCR et l'analyse des séquences.....	64

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Le génome de réovirus.....	16
<b>Figure 2.</b> Réovirus sous ses trois formes.....	17
<b>Figure 3.</b> Cycle de réplication de réovirus.....	19
<b>Figure 4.</b> Schéma de la protéine $\sigma 1$ .....	23
<b>Figure 5.</b> La génétique inverse.....	31
<b>Figure 6.</b> (Figure 1 de l'article) Sequence and structure at the carboxyl-terminal end of tagged $\sigma 1$ proteins.....	58
<b>Figure 7.</b> (Figure 2 de l'article) Plaque formation by the tagged viruses.....	59
<b>Figure 8.</b> (Figure 3 de l'article) Immunoblotting of viral proteins in cells infected with the tagged viral particles.....	60
<b>Figure 9.</b> (Figure 4 de l'article) Replication of tagged viruses.....	61
<b>Figure 10.</b> Chronologie de la création des mutants.....	63
<b>Figure 11.</b> Digestion plasmidique des mutants pT7BacS1-E36Q.....	65
<b>Figure 12.</b> Alignement de séquences des virus générés par génétique inverse.....	67
<b>Figure 13.</b> Immunobuvardage d'infection sur cellules L929.....	70
<b>Figure 14.</b> Effets du traitement à la neuraminidase sur l'infection de cellules L929.....	71
<b>Figure 15.</b> Infection sur cellules MDCK.....	73

## Liste des abréviations

6H	Six histidines
°C	Degré Celçius
%	Pourcentage
$\alpha$	Alpha
$\beta$	Beta
$\mu\text{g}$	Microgramme
$\mu\text{l}$	Microlitre
Å	Angstrom
Ad5	Adénovirus type 5
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
db	double-brin
BHK	<i>Baby hamster kidney cells</i>
CAR	<i>Coxsackievirus-adenovirus-receptor</i>
CAT	<i>Chloramphenicol acetyl tranferase</i>
CHO	<i>Chinese hamster ovary cells</i>
eIf	<i>Eukaryotic initiation factor</i>
HA	Hémaglutinine
IFN- $\beta$	Interféron beta
ISVP	Particule sous-virale infectieuse
JAM-A	<i>Junctional adhesion molécule A</i>
KDa	KiloDalton
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney cells</i>
MEM	<i>Minimum essential medium</i>
ml	Millilitre

MOI	Multiplicité d'infection
MUC1	Mucine type I
ng	Nanogramme
ORF	<i>Open reading frame</i>
p53	Protéine 53
pb	paire de base
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PKR	Protéine kinase dépendante des ARNs bicaténaires
Ras	<i>Rat Sarcoma protein</i>
Rb	<i>Retinoblastoma protein</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i>
SDS	Sodium dodécylsulfate
Sos	<i>Son of Sevenless protein</i>
SV40	<i>Simian virus 40</i>
T1L	Type 1 Lang
T2J	Type 2 Jones
T3A	Type 3 Abney
T3D	Type 3 Dearing
T4N	Type 4 Ndelle
UFP	Unité formatrice de plages
Wt	<i>Wild type</i> (type sauvage)
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i>

*À Jonathan, pour sa patience*

## Remerciements

Je tiens à exprimer ma gratitude envers mon directeur de recherche, Dr Guy Lemay, pour son accueil et son soutien constant. Tout au long de ce projet, il fut un guide attentif et une source d'inspiration. Merci.

Je remercie aussi mes proches, parents et amis pour leur support. Je remercie particulièrement Jonathan pour son écoute et sa patience pendant ces longues années d'étude. Merci à mes parents pour leurs encouragements, vos conseils ont porté fruit.

Merci à Véronique Sandékian et Roland Jabre, mes collègues de laboratoire, pour leurs discussions animées et leur amitié.

# **1. Revue de littérature**

## **1.1 Réovirus**

### **1.1.1 Réovirus chez les Reoviridae**

La famille Reoviridae est constituée de quinze genres regroupés en deux sous-familles selon la présence (par exemple, le genre orthoreovirus) ou l'absence (par exemple, le genre rotavirus) d'une protéine tourelle à la surface des cinq axes de symétrie de la capside externe du virus. Les membres de cette famille disposent d'un génome constitué de neuf, dix, onze ou douze segments d'ARN double-brin codant traditionnellement chacun pour une seule protéine. L'extrémité 5' porte une coiffe, mais l'extrémité 3' n'est pas polyadénylée. Leur surface extérieure est non enveloppée et est composée de deux ou trois couches protéiques organisées selon une symétrie icosahédrale (N=12). La réplication du génome des virus de cette famille se déroule à l'intérieur de cette capside protéique par les enzymes virales (Schiff et al., 2007).

Du genre orthoreovirus, le réovirus de mammifère est originalement isolé par Sabin en 1959, puis classifié par Leon Rosen sous trois sérotypes selon la capacité de neutralisation et d'hémagglutination de la protéine d'attachement  $\sigma 1$  (sigma 1): Type 1 Lang (T1L), Type 2 Jones (T2J) et Type 3 Dearing (T3D) et Abney (T3A) (Day, 2009; Rosen, 1960). Les premiers isolats sont échantillonnés chez de jeunes enfants asymptomatiques de Cincinnati et Mexico et nommés " HE type 4" puis "ECHO type 10" en tant que membres du groupe des entérovirus (Sabin, 1959). Cette nomenclature n'est plus utilisée aujourd'hui. Finalement, un quatrième sérotype, plus rarement étudié, est isolé chez la souris et est désigné Type 4 Ndelle (T4N) (Attoui et al., 2001). Le réovirus de mammifère de type 3 Dearing sera principalement l'objet de ce travail.

### 1.1.2 Épidémiologie et pathogénicité

De par sa structure, le réovirus est un virus très stable. Les principales sources de variation de sa stabilité sont la température, l'humidité et particulièrement l'acidité (Schiff et al., 2007). L'environnement, les lacs, les égouts et les eaux stagnantes en général sont des sources potentielles de contamination. Le virus infectant principalement le système respiratoire et digestif, il peut par conséquent être transmis d'humain à humain par voie respiratoire, orale ou orale-fécale par l'intermédiaire des eaux contaminées (Nathanson & Ahmed, 1997).

Selon l'âge de population étudiée, le taux d'anticorps sérique témoignant d'une exposition à réovirus varie. En effet, il s'échelonne entre moins de 10% de séroprévalence chez les enfants de 7 à 12 mois à plus de 60% chez la population étatsunienne adulte de plus de soixante ans (Tai et al., 2005) et 84% chez la population indienne de plus de vingt ans (Pal & Agarwal, 1968). Ces variations démontrent l'ubiquité et la faible pathogénicité du virus. Habituellement, l'infection a lieu lors de l'enfance, souvent de façon asymptomatique, mais peut aussi parfois être à la source d'une infection légère des voies respiratoires supérieures, gastro-intestinales, du système nerveux central, et, plus rarement, causer une méningite (Ouattara et al., 2008; Schiff et al., 2007) .

Le nom réovirus provient de l'acronyme "*Respiratory Enteric Orphan Virus*" puisqu'il infecte par les voies respiratoires et entériques et n'était associé à aucune pathogénicité lors de sa découverte. Il est maintenant connu qu'une infection par réovirus peut entraîner des symptômes plus graves, surtout chez les patients ayant des capacités immunitaires amoindries. La pathogénicité du virus dépend à la fois de l'hôte, de par sa nature et son immuno-compétence sous-jacente, de la voie d'inoculation et du sérotype viral.

### **Importance de l'hôte**

L'hôte, par sa nature, son âge et son potentiel immunitaire influence le dénouement de l'infection. Réovirus est retrouvé chez une variété d'espèces parmi les mammifères, oiseaux et reptiles (Day, 2009; Schiff et al., 2007). À titre de comparaison, le patron d'évolution de la maladie est différent chez la souris, où l'infection peut être létale, de chez l'homme qui combat habituellement l'infection avec succès.

Par contre, que ce soit chez la souris ou chez l'homme, l'infection sera plus virulente si l'hôte est préalablement immunitairement éprouvé. Par exemple, la souris adulte immunocompétente résout efficacement l'infection alors qu'elle est létale chez le souriceau et la souris SCID (Nathanson & Ahmed, 1997). Plusieurs études démontrent aussi le dénouement de l'infection vers une myocardite, l'atrésie biliaire et le "*black foot syndrome*" chez la souris SCID (Haller et al., 1995; Loken et al., 2004; G. A. Wilson et al., 1994).

### **Importance du lieu d'inoculation et du sérotype sur la dispersion virale**

Il a été observé que le tropisme cellulaire et d'espèce dépendent du sérotype et plus particulièrement sont reliés à certains gènes / protéines. Le tropisme cellulaire et la virulence sont principalement déterminés par la protéine d'attachement  $\sigma 1$ , mais aussi  $\mu 2$  et  $\lambda 3$  (Ooms et al., 2010).

En utilisant la méthode classique de réassortiment (échange de gènes entre différentes souches virales), il a été démontré que S1, codant pour la protéine  $\sigma 1$ , est responsable du neurotropisme et de la dispersion par voie neurale ou hématogène. Aussi, les segments M1, L1, L2 codant respectivement pour les protéines  $\mu 2$ ,  $\lambda 3$  et  $\lambda 2$  induisent la myocardite chez les souris SCID. Ces dernière protéines sont aussi les déterminants de la capacité de réplication virale au foie et de la sévérité de l'hépatite ainsi engendrée

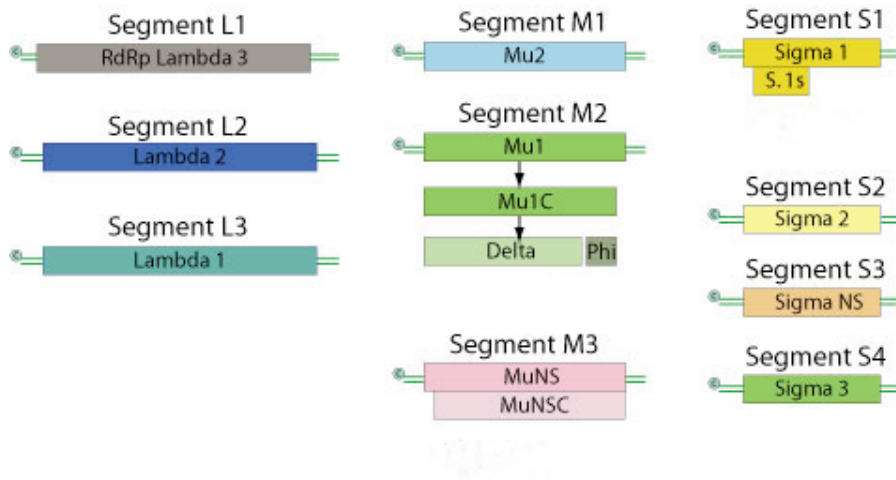
(Nathanson & Ahmed, 1997). L'infection des voies gastro-intestinales est dirigée par le segment L2 et principalement par le segment S1.

Le fait que ces différents gènes influencent le tropisme de l'infection est relatif à la présence de récepteurs cellulaires reconnus par  $\sigma 1$  à la surface de la cellule ou à la capacité de celle-ci de limiter la réplication du virus à divers stades du cycle de réplication.

### 1.1.3 Structure et génétique

Dès 1962, la coloration à l'orangé d'acridine permet d'établir que réovirus possède un génome d'ARN double-brin (Gomatos et al., 1962). Celui-ci est segmenté en 10 brins linéaires nommés en fonction de leur poids moléculaire à la suite de leur migration sur gel de polyacrylamide en petit "*small*" (S1, S2, S3, S4), moyen "*medium*" (M1, M2, M3) et grand "*large*" (L1, L2, L3) (Shatkin et al., 1968). La longueur de chacun des segments varie entre 3,916 pb pour L2 et 1,196 pb pour S4. Au total, le génome est constitué de 23,500 pb.

Les protéines correspondantes aux segments génomiques sont nommées par leurs locutions grecques, mais celles-ci ne correspondent pas toujours adéquatement. Par exemple, le gène L1 encode pour la protéine  $\lambda 3$  et le gène L3 pour la protéine  $\lambda 1$  (figure 1). L'explication repose sur le système, basé sur la migration des segments génomiques, élaboré avant que les propriétés encodées par ceux-ci ne soient identifiées. Aussi, certaines protéines ont été renommées ou ont été identifiées subséquemment aux autres. Pour la plupart des protéines, le cadre de lecture (ORF) débute au premier codon AUG. Pour la protéine  $\sigma 1s$ , le cadre de lecture débute au premier AUG n'étant pas dans le cadre de lecture de la protéine  $\sigma 1$ . L'introduction du génome ARN dans une cellule coinfectée par un autre virus suffit à débiter le cycle de réplication du virus (Roner et al., 1990).



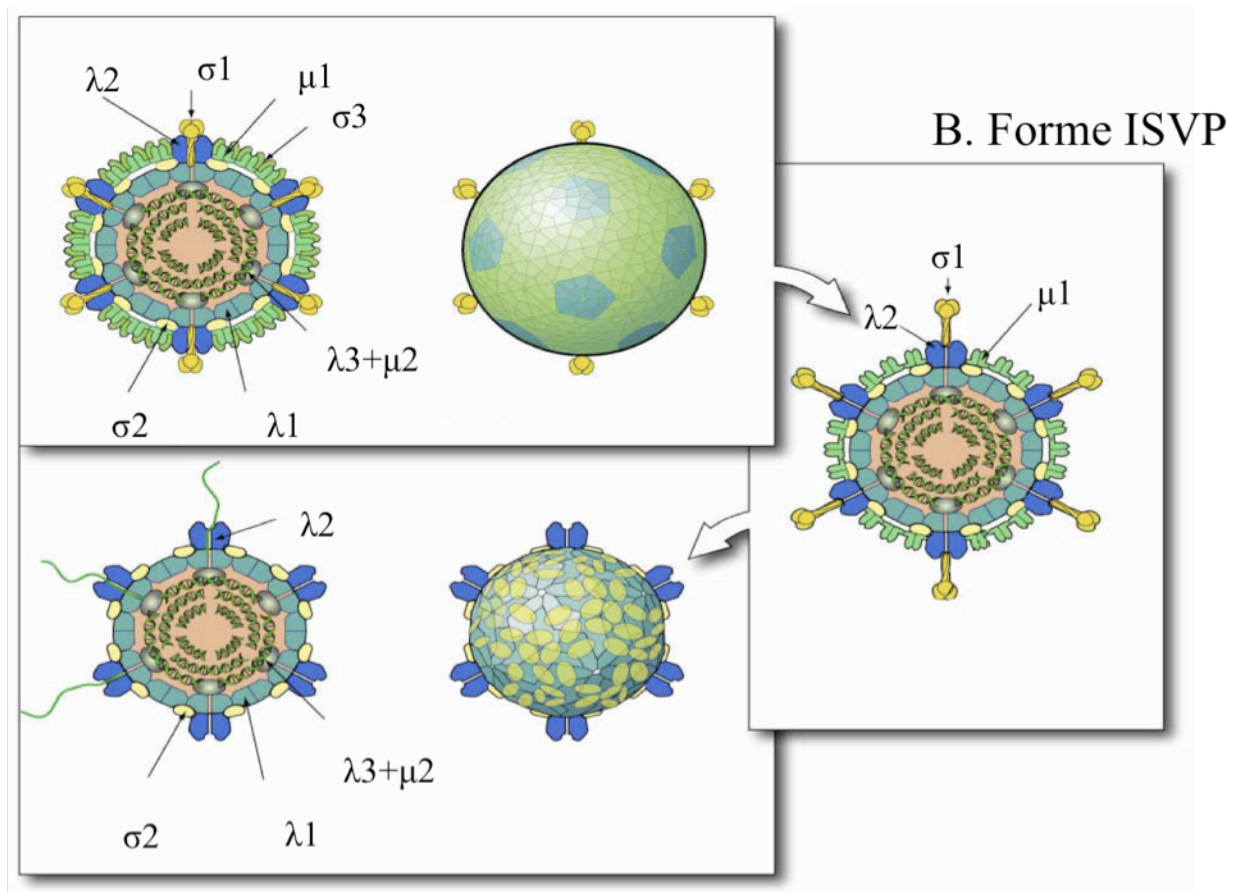
**Figure 1.** Génome de réovirus. Le génome de réovirus est constitué de dix segments d'ARN double-brin. (Adapté de ViralZone, [www.expasy.ch/viralzone](http://www.expasy.ch/viralzone), Swiss Institute of Bioinformatics)

L'arrangement particulier du génome de réovirus a facilité son étude. En effet, les expérimentations par réassortiment permettent de démontrer quelle fonction est associée à chacun des gènes et ainsi réaliser une catégorisation des sérotypes (Joklik & Roner, 1995). Au niveau structural, chaque segment possède une coiffe à l'extrémité 5', coiffe produite par les enzymes virales. Cette coiffe permet la transcription du brin d'ARN, augmente sa stabilité et pourrait être impliquée dans le processus d'encapsidation des segments du génome (Schiff et al., 2007). L'extrémité 5' de tous les segments positifs débute par la séquence 5'-GCUA et l'extrémité 3' se termine par UCAUC-3', ces segments seraient important pour l'encapsidation et la reconnaissance par la polymérase virale (Roner & Roehr, 2006; Schiff et al., 2007)

Chaque segment encode une protéine, sauf pour S1 et M3, qui sont traduits en la protéine  $\sigma 1$  et  $\sigma 1s$  et  $\mu NS$  et  $\mu NSC$ , respectivement. Huit des douze protéines sont structurales ( $\lambda 1$ ,  $\lambda 2$ ,  $\lambda 3$ ,  $\mu 1$ ,  $\mu 2$ ,  $\sigma 1$ ,  $\sigma 2$ ,  $\sigma 3$ ). Les autres sont impliquées dans le cycle de réplication ( $\mu NS$ ,  $\mu NSC$ ,  $\sigma NS$ ,  $\sigma 1s$ ). La particule virale est constituée de deux capsides protéiques: la première est composée des protéines  $\lambda 2$ ,  $\mu 1$ ,  $\sigma 1$  et  $\sigma 3$ , et la capside interne

des protéines  $\lambda 1$ ,  $\lambda 3$ ,  $\mu 2$  et  $\sigma 2$  (figure 2). Selon la constitution protéique des deux capsides et de leur conformation, le virus peut exister sous trois formes différentes, soit le virion, l'ISVP (particule sous-virale infectieuse) et le nucléoïde. Seulement le virion et l'ISVP ont le pouvoir d'infecter. Le nucléoïde est actif au niveau de la transcription du génome viral (Schiff et al., 2007).

### A. Forme virion



### C. Forme nucléoïde

**Figure 2:** Réovirus sous ses trois formes. En A), le virion est composé de toutes les protéines structurales. En B), la particule sous-virale infectieuse et en C), la forme

nucléoïde. (Adapté de ViralZone, [www.expasy.ch/viralzone](http://www.expasy.ch/viralzone), Swiss Institute of Bioinformatics)

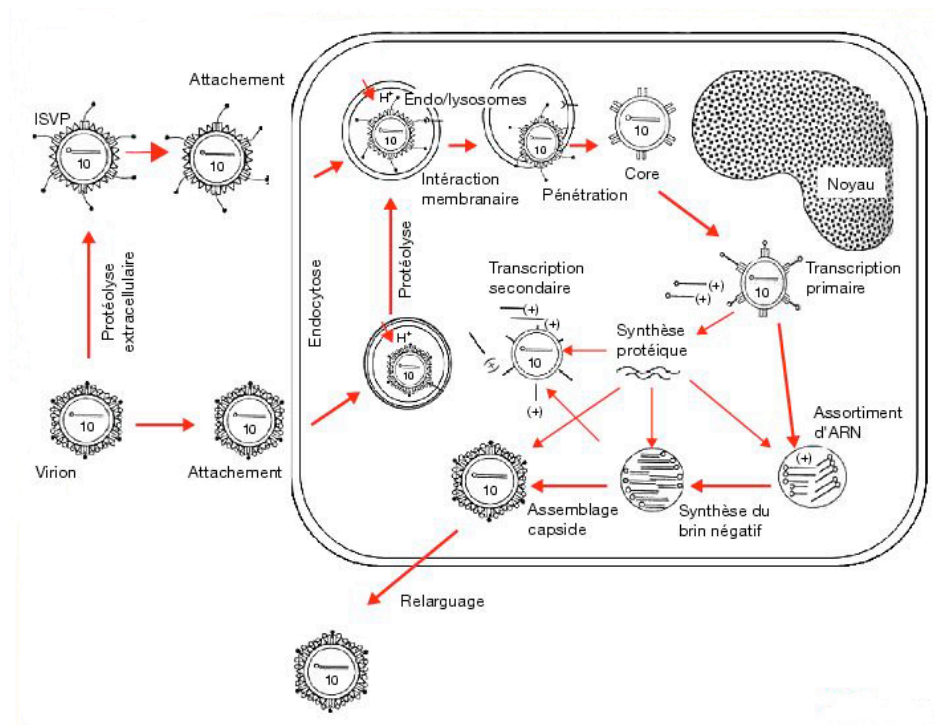
L'utilisation de la chymotrypsine ou de la trypsine permet de passer artificiellement de la forme de virion à ISVP à nucléoïde. Ces deux enzymes miment l'action des enzymes intestinales et dégradent les protéines de la capsid (Silverstein et al., 1972). Plus spécifiquement, le virion est la forme la plus stable et sous laquelle les virus sont relâchés par la cellule. La forme ISVP se distingue de la première par la perte de la protéine  $\sigma 3$  à la surface de la capsid virale, le scindement de la protéine  $\mu 1$ , et par l'extension du trimère de protéines  $\sigma 1$ . La forme nucléoïde ne possède aucune des trois protéines de la capsid externe ( $\sigma 3$ ,  $\sigma 1$  et  $\mu 1$ ) et la protéine  $\lambda 2$  a subi un changement de conformation (Schiff et al., 2007).

#### 1.1.4 Cycle de réplication

Réovirus pénètre l'organisme par le tractus respiratoire ou entérique. Par la voie orale/digestive, l'entrée se déroule par l'intermédiaire des récepteurs présent à la surface de la cellule, soit les acides sialiques pour le sérotype T3D (Barton, Connolly et al., 2001), puis JAM-A pour tous les sérotypes (Barton, Forrest et al., 2001). Un autre récepteur pourrait aussi être impliqué (Antar et al., 2009). Si la particule virale est sous forme de virion suite à l'internalisation par les  $\beta 1$  intégrines (Maginnis et al., 2006), le virion entre dans la cellule par endocytose via les clathrines (Maginnis et al., 2008). La capsid externe est dégradée par protéolyse suite à la fusion de l'endocytosome aux lysosomes de la cellule. La particule virale est alors sous forme d'ISVP et acquiert la capacité de traverser la membrane de l'endosome. Le virion peut aussi être dégradé en ISVP par les enzymes digestives protéolytiques, ce qui permet l'extension de la protéine d'attachement  $\sigma 1$ , la dégradation de la protéine  $\sigma 3$  et le clivage des protéines  $\mu 1$  et  $\mu 1c$  (Mendez et al., 2003). L'ISVP ainsi généré peut traverser la membrane plasmique sans passer par l'endosome. Le premier contact de la forme ISVP s'effectue au niveau apical des cellules M des plaques de

Peyer's, cellules spécialisées en transport transépithélial, et ne nécessite pas d'endocytose par cette voie (figure 3) (Amerongen et al., 1994).

Suite à l'entrée, la particule sous-virale infectieuse est dégradée en nucléoïde par les enzymes cellulaires. Cette forme virale est active au niveau de la transcription et synthétise les ARNm à partir du brin de polarité négative. La transcription est effectuée dans la capsid interne du virus. Les ARNm de polarité positive nouvellement synthétisés sont utilisés pour la traduction primaire des protéines virales par les enzymes cellulaires, marquant ainsi le début de la phase précoce. Les protéines nouvellement formées s'associent aux ARNm pour former les structures intermédiaires répliquatives dans lesquels le brin positif est aussi utilisé pour la synthèse du brin complémentaire (négatif). La transcription secondaire s'effectue dans les capsides internes nouvellement formées. Celles-ci sont finalement revêtues de la capsid externe, puis relâchées par lyse cellulaire (Schiff et al., 2007).



**Figure 3.** Cycle de réplication de réovirus. (Ouattara et al., 2008)

### 1.1.5 L'attachement du virus, une étape clé

Le premier récepteur découvert pour réovirus fut les acides sialiques. Effectivement, il fut observé, dès 1962, que le traitement pré-infection avec la neuraminidase des érythrocytes, et dès 1985, que le traitement des cellules L929, diminue la capacité d'infection du virus (Gentsch & Pacitti, 1985). Les liens créés entre  $\sigma 1$  et les acides sialiques sont de faible affinité et pourraient servir à restreindre le virus proche de la cellule afin que la liaison au récepteur principal, JAM-A, soit facilitée (Barton, Connolly et al., 2001). Par contre, la liaison du virus aux acides sialiques n'est pas un pré-requis obligatoire à l'attachement du virus au récepteur JAM-A (Barton, Forrest et al., 2001).

Les acides sialiques sont présents sur une vaste diversité de cellules, dont les cellules épithéliales où ils sont polarisés au niveau apical de la cellule. Ce type de sucre est souvent surexprimé à la surface des cellules tumorales et pourrait augmenter la capacité de migration transendothéliale de celles-ci (Ulloa & Real, 2001).

Il est accepté que le récepteur principal de réovirus est la protéine JAM-A (F11R/JAM/JAM1), un membre de la superfamille des immunoglobulines (Barton, Forrest et al., 2001). En compagnie des protéines occludines, des claudines et du coxsackievirus et adenovirus récepteur (CAR), qui servent aussi de récepteur viral (Bergelson, 2009), JAM-A est retrouvé du côté apicolatéral des jonctions serrées des cellules épithéliales et endothéliales.

Suivant l'attachement aux acides sialiques et à la molécule JAM-A, le virion est internalisé par endocytose via les beta intégrines de la cellule. L'entrée de la forme ISVP de réovirus ne nécessite pas l'aide de ces molécules (Maginnis et al., 2006).

En 2009, Antar et ses collaborateurs ont proposé l'existence d'un nouveau récepteur toujours inconnu à ce jour pour réovirus. En effet, l'étude a démontré qu'une souche de réovirus ne possédant pas la capacité de se lier aux acides sialiques (T3SA-) se réplique

efficacement dans le cerveau et l'intestin de la souris JAM-A  $-/-$ . Qui plus est, la souris infectée par ce virus a aussi la faculté de le transmettre à ses compagnes JAM-A  $-/-$  (Antar et al., 2009).

## 1.2 La protéine $\sigma 1$

### 1.2.1 La structure

La protéine  $\sigma 1$  est constituée de 455 acides aminés formant un homotrimère de 480Å de longueur et 90Å de largeur. La protéine peut être divisée en trois sections distinctes, soit la tête en C-terminal, le corps au centre et la queue en N-terminal (figure 4). La tête est formée des résidus 310 à 455 assemblés en feuillets  $\beta$  (type clé grecque) de façon globulaire. Le corps est formé des résidus 170 à 309 et est assemblé en quatre feuillets  $\beta$  en N-terminal (résidus 170 à 235) suivis d'une hélice  $\alpha$  (résidus 236 à 251), puis de trois feuillets  $\beta$  (résidus 252 à 309) (Reiter et al., 2011). La structure N-terminale de la protéine n'ayant pas encore été cristallisée avec succès, celle-ci est prédite comme un assemblage d'hélices alpha, mais demeure inconnue.

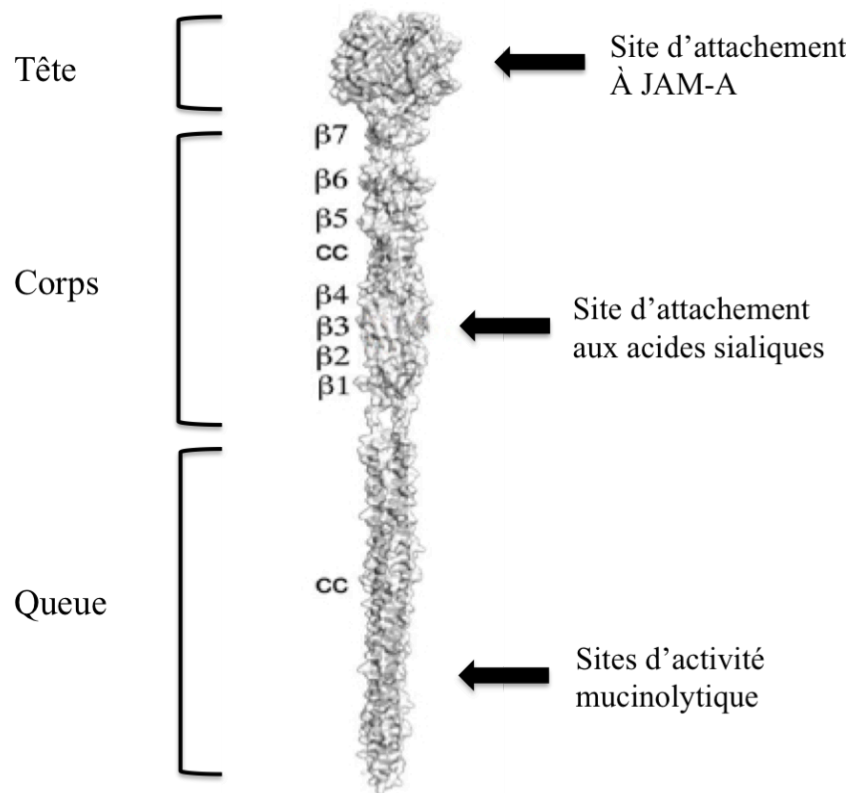
### 1.2.2 $\sigma 1$ , la protéine d'attachement

La protéine  $\sigma 1$  présente les sites d'attachement du virus. Comme pour une variété de virus, la protéine détient une affinité pour plusieurs récepteurs exposés sur la cellule. Pour chacun des récepteurs, un site particulier est impliqué sur  $\sigma 1$ . Plus précisément, plusieurs études ont démontré que la liaison est possible sur les acides sialiques de type  $\alpha 2,3$  et  $\alpha 2,6$  (Paul et al., 1989) et que le point de liaison serait situé au niveau des acides aminés 198, 202 et 204 de la protéine  $\sigma 1$  (Chappell et al., 1997) (Dermody et al., 1990; Rubin et al., 1992). Récemment, il fut démontré que les sucres à liaison  $\alpha 2,8$  des acides sialiques sont aussi de potentiels points de liaison. La même étude a aussi démontré l'existence de deux nouveaux points de contact, soit les acides aminés en position 203 et 205 (Reiter et al.,

2011). Ainsi, l'attachement aux acides sialiques s'effectue au niveau des acides aminés 198, 202, 203, 204 et 205 de  $\sigma 1$  pour le sérotype T3D (figure 4) (Reiter et al., 2011). Étonnamment, ces sites sont situés sur la portion du corps de la protéine  $\sigma 1$  et non pas sur la tête où ils seraient plus accessibles. La liaison est de faible affinité et pourrait limiter le virus à la surface cellulaire afin de favoriser son contact avec le récepteur principal (Barton, Connolly et al., 2001).

Le récepteur principal de réovirus est la protéine transmembranaire JAM-A. Cette protéine servirait de lieu d'attache pour tous les sérotype de réovirus. L'attachement réside au niveau de la portion globulaire de  $\sigma 1$  (figure 4). Plus précisément, une mutation des acides aminés 369, 380, 381 ou 423 de  $\sigma 1$  diminue l'affinité entre les deux protéines (Kirchner et al., 2008). Le trimère de protéines  $\sigma 1$  lie trois monomères différents de JAM-A (Kirchner et al., 2008; Zhang et al., 2010). Chaque protéine  $\sigma 1$  de l'homotrimère lie une molécule du dimère de JAM-A avec une affinité plus grande que celle liant deux monomères de JAM-A (Kirchner et al., 2008).

Aussi, une activité glycosidase de  $\sigma 1$  pourrait influencer la capacité d'attachement du virus. Cette activité pourrait avoir une influence au niveau de l'attachement du virus aux cellules présentant de la mucine et sera discuté plus en détails dans la section suivante.



**Figure 4.** Schéma de la protéine  $\sigma 1$ . La protéine est séparée en trois régions distinctes, la tête (acides aminés 310 à 455), le corps (acides aminés 170 à 309) et la queue (acides aminés 1 à 169). Le corps est formé majoritairement de feuillets beta ( $\beta 1$  à  $\beta 7$ ) et d'une hélice alpha (cc). La structure de la queue est prédite comme un enchainement d'hélices alpha. Les sites d'attachement et d'activité mucinolytique sont identifiés par une flèche. L'image est adaptée de (Reiter et al., 2011)

### 1.2.3 $\sigma 1$ , une protéine enzymatique

La capacité de la protéine  $\sigma 1$  d'hydrolyser les sucres à liaison de type  $\alpha$  suggère son importance dans le contexte d'infection de réovirus. Effectivement, il est connu que le virus infecte via les voies respiratoire et intestinale de l'hôte (Excoffon et al., 2008; Schiff et al., 2007). Or, les cellules épithéliales du tractus respiratoire, tout comme celles du système

digestif sont recouvertes de mucine. Cette molécule est constituée d'une portion protéique et d'une portion glycosylée. Elle peut être sécrétée ou exprimée de façon transmembranaire à la surface apicale des cellules épithéliales. La portion glycosylée varie en fonction du type cellulaire et de la localisation du tissu. Aussi, il existe un grand polymorphisme au niveau de cette molécule dans la population. La mucine de type 1 est exprimée de façon transmembranaire et est la forme la plus ubiquitaire au niveau des tissus mucosaux (Linden et al., 2008). La mucine sert de barrière physique contre l'invasion des pathogènes, tant bactériens que viraux. Paradoxalement, plusieurs microbes ont coévolué pour faire de cette barrière une porte d'entrée, notamment par la production d'enzymes dégradant la portion protéique ou glycosylée de la mucine (Linden et al., 2008). Réovirus semble utiliser cette stratégie pour optimiser l'invasion.

Il est intéressant d'observer que la mucine de type 1 est surexprimée dans certains types de cancer (Kufe, 2009). Son expression de façon non régulée est accompagnée d'une glycosylation anarchique et en fait une cible thérapeutique de choix (Limacher & Acres, 2007).

Il a été proposé, par une étude d'analyse de séquences menée au laboratoire, que la protéine d'attachement  $\sigma 1$  possède une activité glycosidase pouvant dégrader certains sucres (Bisaillon & Lemay, 1999). En effet, une première étude a souligné l'analogie de séquence (98,7%) entre le segment N-terminal de  $\sigma 1$  et le lysozyme du bacteriophage SF6 (Bisaillon & Lemay, 1999). Ces travaux ont menés à une autre étude précisant le potentiel enzymatique de la protéine d'attachement. Il fut déterminé que  $\sigma 1$ , sous sa forme recombinante, hydrolyse le substrat p-NP-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide. Il fut aussi déterminé que la forme ISVP, mais pas la forme virion, possède aussi cette activité. Finalement, ce travail a aussi permis d'établir que MUC1 inhibe l'infection de réovirus sous sa forme virion alors que la forme ISVP, dont le site d'activité enzymatique est exposé, conserve cette capacité. L'activité enzymatique de la protéine est reliée à deux sites précis, soit le glutamate (E) en position 36 et l'aspartate (D) en position 54 (figure 4). L'acide

aminé en position 36 est proposé comme l'acteur principal de l'hydrolyse alors que l'acide aminé en position 54 servirait de lieu de liaison au substrat (Bisaillon et al., 1999).

Une étude subséquente menée au laboratoire (résultats non publiés) a corroboré l'importance de ce site pour l'activité mucinolytique de  $\sigma 1$ . L'expérience proposait l'utilisation de virus recapsidés avec la protéine  $\sigma 1$  portant une substitution au niveau de l'acide aminé 54 ou 36. Pour ce faire, la capside externe du virus de type sauvage était digérée par la chymotrypsine jusqu'à la forme de nucléoïde. La capside externe était par la suite reconstituée par incubation avec les protéines  $\sigma 3$ ,  $\mu 1$  et  $\sigma 1$  mutées. Les protéines étaient produites à partir de baculovirus (Chandran et al., 2001).

Suite à la production de virus portant une substitution sur  $\sigma 1$  par le système de recapsidation, il fut possible d'examiner l'importance des sites d'activité enzymatique de réovirus sur les cellules exprimant la mucine. En effet, l'infection sur cellules MDCK et MDCK-MUC1 a démontré que les virions recapsidés, soit avec les  $\sigma 1$  sauvages ou E36Q, présentent une infectivité réduite de 3,5 à 6 fois en présence de mucine. Par contre, les ISVPs recapsidés avec une protéine  $\sigma 1$  sauvage augmente leur infectivité de 2,5 fois et les ISVPs possédant une protéine  $\sigma 1$ -E36Q voient leur infectivité diminuer de 8 fois. (Svitek, 2004)

Ces deux études ont donc démontré l'existence et l'importance de l'activité mucinolytique de réovirus pour l'infection de cellules exprimant la mucine. Par contre, le système de recapsidation ne permet pas l'étude de l'infection sur plus d'un cycle de réplication. En effet, seule la protéine était modifiée et le génome du virus ne portait pas la substitution.

À ce jour, devant l'impossibilité de produire un virus conservant la substitution induite sur plusieurs cycles de réplication, aucune étude n'a encore été effectuée chez l'animal concernant les capacités mucinolytiques de réovirus. Aussi, il est encore difficile

de distinguer l'influence de l'attachement aux acides sialiques sur l'activité mucinolytique de la protéine  $\sigma 1$ .

#### **1.2.4 $\sigma 1$ et la modification du tropisme chez Réovirus et Adénovirus**

Il a été établi que la protéine  $\sigma 1$  est le garant principal du tropisme de réovirus. En effet, il fut déterminé, dès les premières études sur le virus, que la protéine d'attachement est responsable de la voie de dissémination sanguine ou neuronale (Tyler et al., 1986). Il fut aussi démontré que le tropisme du virus pour les tissus du système nerveux est relié à la protéine  $\sigma 1$  (Dichter & Weiner, 1984; Weiner et al., 1980).

Il sera discuté ultérieurement que réovirus est présentement à l'essai en tant que thérapie en oncologie. Les propriétés oncolytiques de réovirus sont imputable à une défaillance des cellules transformées à se protéger du virus plutôt qu'à un tropisme vers ces dernières. Or, une des approches proposées en virothérapie consiste à rediriger l'infection des virus vers les cellules tumorales en modifiant le tropisme viral (Woo et al., 2006).

Suivant la logique que  $\sigma 1$  est responsable du tropisme et que cette dernière est semblable à la protéine d'attachement de l'adénovirus (Chappell et al., 2002), quelques essais de virus hybrides ont été effectués avec succès. En effet, Mercier et al. ont démontré que le vecteur adénovirus Ad5 exprimant les 44 acides aminés en N-terminal de la protéine d'attachement de l'adénovirus fusionnés à la protéine  $\sigma 1$  de réovirus T3D à partir de l'acide aminé 18 infecte avec succès les cellules CHO (Chinese hamster ovary cells). Ce type cellulaire n'exprime pas le récepteur naturel d'adénovirus, soit CAR (Mercier et al., 2004; Weaver et al., 2012). En interchangeant la protéine d'attachement d'adénovirus pour la protéine  $\sigma 1$ , il fut possible d'infecter des cellules exprimant les récepteurs de réovirus, soit les acides sialiques et JAM-A. Cette stratégie est toujours étudiée depuis (Chappell et al., 2002; Schagen et al., 2008).

Antérieurement à ces études, d'autres stratégies ont été exploitées afin de modifier le tropisme d'adénovirus. Le virus fut modifié afin que la protéine d'attachement soit additionnée d'une étiquette, souvent une série de six histidines (6His) ou neuf acides aminés dérivés de l'héماغلوتينine (HA), puis exposée à un type cellulaire permissif. Le type cellulaire devait exprimer le contre-récepteur pour le tag, soit la portion Fv de l'anticorps anti-6His ou anti-HA, selon le cas (Douglas et al., 1999; Einfeld et al., 1999). Ces études ont démontré qu'il est possible de modifier le tropisme du virus par l'addition d'une étiquette à la protéine d'attachement de l'adénovirus.

L'ajout d'un tag sur une protéine de réovirus a aussi été tenté par quelques laboratoires. En effet, Rouault et Lemay ont réussi à ajouter un segment de six histidines à la portion N-terminale de la protéine  $\sigma 3$  (Rouault & Lemay, 2003). Par contre, par l'utilisation de la méthode de recapsidation, un seul cycle de réplication est possible avec ce virus. Le groupe de Hoeben aurait réussi à modifier le tropisme de réovirus et ajouter un tag de six histidines à l'extrémité de  $\sigma 1$ . Le groupe a utilisé une stratégie particulière, soit l'infection par un virus de type sauvage de cellules permissives exprimant constitutivement la protéine  $\sigma 1$  modifiée. Suite à l'infection, la protéine modifiée serait incorporée à la capsid du virus et le virus produit pourrait infecter les cellules exprimant seulement le récepteur adapté à la protéine  $\sigma 1$  modifiée et non plus les récepteurs naturels de réovirus. De plus, selon les auteurs, le segment nucléique de S1 portant l'addition des six histidines serait incorporé au génome du virus (van den Wollenberg et al., 2008). Cette approche n'a pas été tentée par d'autres groupes.

Ces diverses approches ont démontré la possibilité de modifier le tropisme de réovirus. Cette méthode serait une avenue prometteuse à emprunter en virothérapie.

## **1.3 Réovirus T3D, un virus oncolytique**

### **1.3.1 La découverte**

Il fut observé, dès 1977, que réovirus infecte de façon préférentielle les cellules transformées (cancéreuses) par rapport aux cellules saines. Effectivement, deux groupes différents ont démontré que réovirus T3D a la capacité de lyser les cellules transformées par l'antigène grand T du SV40, laissant les cellules non transformées intactes (Duncan et al., 1978; Hashiro et al., 1977). Cette découverte, quoique impromptue, n'est pas surprenante. Depuis le milieu du 18<sup>e</sup> siècle, l'effet antitumoral de certains virus avait été observé (Dock, 1904). Enfin, dès 1903, plusieurs virus ont été testés pour leur spécificité envers les cellules tumorales. Par exemple, le virus influenza (Dock, 1904), le virus de l'herpès et le virus de la vaccine ont été utilisés à ces fins (Kelly & Russell, 2007). Cette approche thérapeutique s'est étiolée avec le temps, faute de sécurité. Depuis la fin des années 1990, une recrudescence de l'intérêt pour la virothérapie est observée, en parallèle d'un renforcement au niveau des règles de sécurité pour les essais cliniques (Hammill et al., 2010; Russell, 2002).

### **1.3.2 Le mécanisme oncolytique et ses limites**

Depuis 1991, plusieurs virus ont été étudiés pour leurs propriétés antitumorales (Aghi & Martuza, 2005). Ceux-ci doivent démontrer une sélection au niveau des cellules infectées et doivent être capable d'effectuer un cycle de réplication complet et de lyser la cellule suite à l'infection. Certains virus présentent ces caractéristiques sous leur forme atténuée, modifiée au niveau génétique ou de leur forme sauvage (Comins et al., 2008). Actuellement, la forme sauvage de réovirus est utilisée en essais cliniques sous le nom REOLYSIN® (Hingorani et al., 2011; Oncolytics Biotech releases REOLYSIN phase I clinical trial results," 2002; Stoeckel & Hay, 2006).

La sélectivité de réovirus pour les cellules transformées tient du fait des modifications encourues par la cellule plutôt que des attributs du virus. En effet, lors de l'infection d'une cellule normale, la présence du génome viral est détectée et entraîne une cascade de signalisation pouvant mener à la sécrétion d'interféron. L'interféron entraîne la production de plusieurs facteurs pouvant interférer avec la réplication virale. Parmi ceux-ci, la protéine kinase ARN double-brin dépendante (PKR). PKR possède un domaine régulateur en N-terminal capable de lier l'ARN bicaténaire. Ce faisant, PKR est dimérisée et son domaine catalytique en C-terminal s'active par autophosphorylation. L'activation de PKR engendre la phosphorylation du facteur d'initiation eIF2 $\alpha$  et conduit à l'arrêt de la production protéique de la cellule (Balachandran & Barber, 2007; Pindel & Sadler, 2011). La production protéique de la cellule suspendue empêche par le fait même la réplication du virus. L'interféron bêta libéré signale aux cellules avoisinantes la présence de l'intrus, empêchant la prolifération virale par l'activation de PKR (Shmulevitz et al., 2005).

De façon sommaire, lors de l'infection de réovirus d'une cellule transformée par l'oncogène Ras ou Sos (Son of Sevenless), PKR ne peut être phosphorylée et demeure dans son état inactif (Strong et al., 1998). La cellule traduit alors les protéines virales, le virus se réplique et lyse la cellule. Il est à noter que la transformation des cellules par Ras est aussi associée à une augmentation des protéases de la cellule (Collette et al., 2004). Cette augmentation permet une meilleure décapsidation de réovirus, augmentant son infectivité (Marcato et al., 2007). La présence d'un Ras altéré ne serait pas le seul responsable de la permissivité de réovirus pour les cellules transformées. En effet, l'altération ou la délétion de gènes suppresseurs de tumeur tel que p53 ou Rb pourrait aussi faciliter l'infection de la cellule tumorale (Comins et al., 2008; Kim et al., 2010).

La virothérapie par réovirus, malgré ses résultats prometteurs (Harrington et al., 2010; Lal et al., 2009), rencontre quelques obstacles. En effet, en se basant sur les essais effectués chez la souris SCID, cette approche pourrait présenter un risque au niveau de la pathogénicité chez les patients immunosupprimés (Loken et al., 2004). Une forme atténuée

du virus présentant une forme tronquée de la protéine  $\sigma 1$  pourrait fournir une piste de solution (Harrington et al., 2010; Kim et al., 2011). Aussi, les récepteurs naturels de réovirus sont retrouvés de façon ubiquitaire dans l'organisme. Une modification du tropisme au niveau de l'attachement du virus pourrait permettre un meilleur contrôle de la dissémination. Une telle modification de tropisme, si on souhaite qu'elle se maintienne au fur et à mesure que le virus se propage, demande la modification du génome viral par génie génétique, ce qui n'était pas possible jusqu'à l'introduction de la technique de génétique inverse.

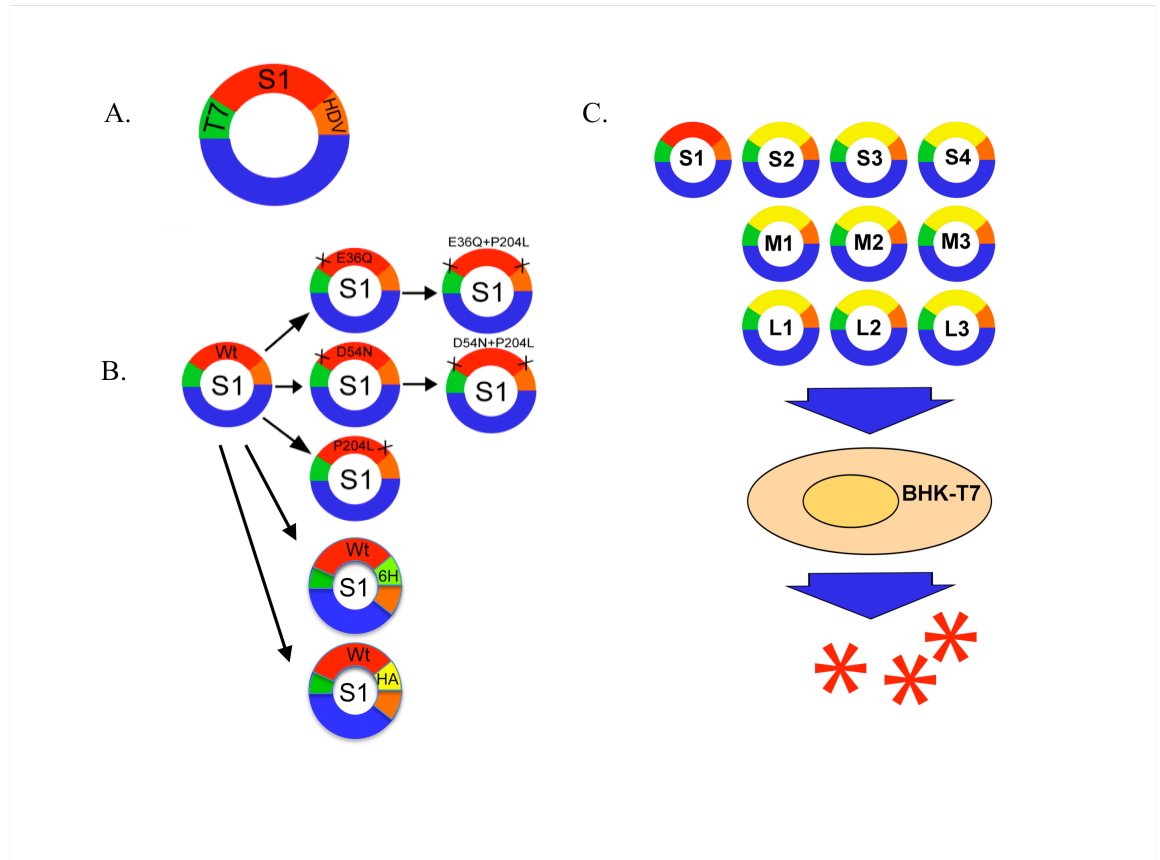
## **1.4 La génétique inverse**

### **1.4.1 Le concept**

La génétique dite classique repose sur l'observation d'un phénotype suivi de l'explication de celui-ci au niveau génétique. La génétique inverse, par définition, repose sur la méthode contraire. En effet, le génotype de l'organisme est modifié pour en observer les effets sur le phénotype (Lemay, 2011).

### **1.4.2 Le mécanisme**

Les premières tentatives de mise au point d'un système de génétique inverse pour réovirus remontent à 1990. En effet, il fut démontré que la transfection de l'ARN de réovirus engendre la production de particules infectieuses (Roner et al., 1990). Par la suite, un réel système de génétique inverse impliquant la transfection des gènes de réovirus et la coinfection par un virus auxiliaire fut proposé. Un segment exogène à réovirus (gène rapporteur CAT) fut inséré dans la particule virale par cette méthode (Roner & Joklik, 2001).



**Figure 5.** La génétique inverse. A) Chaque segment du génome viral de réovirus a été cloné sur un plasmide. Le gène de la polymérase T7 est cloné en amont du gène et le ribozyme du virus de l'hépatite delta en aval. B) Les substitutions ou addition sont effectuées par mutagenèse dirigée sur le plasmide portant le segment S1. C) Les dix plasmides sont transfectés en cellules BHK-T7 afin de récupérer le virus.

La méthode utilisée pour la présente étude repose sur le système érigé par le laboratoire de Dr Dermody en 2007 (Kobayashi et al., 2007). L'équipe du Dr Dermody a effectué le clonage de chacun des 10 gènes de réovirus sur des plasmides. Les extrémités des segments sont flanquées du promoteur de la polymérase T7 en 5' et du ribozyme du virus de l'hépatite delta en 3'. Ces ajouts sont nécessaires à produire un segment dont les

extrémités abordent les séquences conservés 5'-GCUA et UCAUC-3'. Les dix plasmides sont par la suite transfectés. La méthode originale proposait la transfection des 10 segments de réovirus en coinfection du virus de la vaccine portant un vecteur de la polymérase T7. La présente étude propose plutôt de transfecter les 10 plasmides dans un type cellulaire exprimant de façon constitutive la polymérase ARN-T7 (BHK-T7) (figure 5). Cette approche modifiée a aussi plus récemment été adoptée par le groupe du Dr Dermody. Finalement, les gènes de réovirus sont par la suite transcrits, traduits et répliqués. Le virus infectieux est récupéré par sélection des plages de lyse sur cellules Vero.

## **2. Problématique et objectifs du projet**

### **2.1 Problématique**

Réovirus est présentement une alternative intéressante en virothérapie. En effet, son potentiel oncolytique en fait un candidat de choix dans la lutte au cancer. Par contre, le spectre de sa pathogénécité chez les sujets immunosupprimés et l'ubiquité de ses récepteurs laisse suggérer que le potentiel de réovirus pourrait être amélioré.

La première étape du cycle d'infection de réovirus est son entrée par l'intermédiaire de ses récepteurs JAM-A et les acides sialiques à la surface cellulaire. Il fut démontré que les acides sialiques, tout comme la mucine, sont exprimés de façon accrue et anarchique chez les cellules transformées. Or l'étude de l'importance de l'activité mucinolytique de réovirus reste à perfectionner. Aussi, l'importance de cette activité demeure à distinguer du potentiel d'attachement aux acides sialiques. Surtout, devant l'incapacité d'obtenir un virus mutant portant les substitutions au niveau de son génome, l'effet de ses propriétés sur plusieurs cycles de réplication demeure à déterminer.

L'ajout d'un tag afin de modifier le tropisme de réovirus demeure une approche intéressante afin de pallier à l'ubiquité de ses récepteurs. Le groupe de Hoeben semble avoir réussi à produire un virus portant l'étiquette six histidine à l'extrémité de  $\sigma 1$ . Par contre, ce résultat n'a toujours pas été corroboré par un second laboratoire.

Finalement, la faisabilité de la méthode de génétique inverse proposée par le laboratoire de Dr Dermody demeurerait à établir lors des débuts des travaux de la présente étude.

### **2.2 Objectifs du projet**

Le présent projet se décline en plusieurs objectifs. Premièrement, démontrer, à titre d'étude de preuve de concept, qu'il est possible d'ajouter un tag, aussi long que 40 acides aminés, à la protéine  $\sigma 1$  en conservant l'infectivité du virus et que celui-ci est conservé sur

plusieurs cycles de réplication. Cet objectif vise aussi à démontrer l'utilité de la méthode de génétique inverse pour les virus ARN double brin. Les résultats sont démontrés au chapitre 3, par l'article " **Introduction of exogenous polypeptides on mammalian reovirus outer capsid using reverse genetics** ", J Virol Methods. 2012 Feb;179(2):342-50.

Deuxièmement, ce projet vise à entamer une caractérisation des virus mutés en leur site d'attachement aux acides sialiques ou d'activité mucinolytique, ou une combinaison de ces substitutions, quant à leur capacité de réplication dans deux lignées cellulaires. Le premier défi de cet objectif est d'insérer les substitutions correspondantes sur la protéine  $\sigma 1$  tout en conservant l'infectivité du virus. Effectivement, modifier la protéine d'attachement du virus pourrait engendrer des conséquences sur toutes les étapes du cycle de réplication, que ce soit au niveau de la structure du virus, de ses capacités d'attachement, de décapsidation, de réplication du matériel génétique, de l'assemblage du virion ou de la relâche. Finalement, la substitution doit être conservée sur plusieurs cycles de réplication, ce que les méthodes auparavant utilisées, telles que la recapsidation, ne permettaient pas. Les résultats obtenus sont présentés au chapitre 4.

### **3. Ajout d'un tag à l'extrémité N-terminale de $\sigma 1$**

L'article " **Introduction of exogenous polypeptides on mammalian reovirus outer capsid using reverse genetics** " démontre qu'il fut possible d'ajouter trois marqueurs différents à l'extrémité 3' du segment S1 par la méthode de génétique inverse. La présence du marqueur fut confirmée par immunobuvardage sur les virions issus de trois passages viraux tel que le démontre la figure 3 de l'article. Aussi, la constance de l'infectivité malgré l'ajout des divers tags fut démontrée par des titrages par formation de plages (figure 2 de l'article) et par une étude de cinétique d'infection (figure 4 de l'article).

## **Addition of exogenous polypeptides on the mammalian reovirus outer capsid using reverse genetics**

Virginie Brochu-Lafontaine, Guy Lemay\*

*Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal, Montréal, Qc.*

*Canada H3C 3J7*

## ABSTRACT

Addition of exogenous peptide sequences on viral capsids is a powerful approach to study the process of viral infection or to retarget viruses toward defined cell types. Until recently, it was not possible to manipulate the genome of mammalian reovirus and this was an obstacle to the addition of exogenous sequence tags onto the capsid of a replicating virus. This obstacle has now been overcome by the advent of a plasmid-based reverse genetics system. In the present study, reverse genetics was used to introduce different exogenous peptides, up to 40 amino acids long, at the carboxyl-terminal end of the  $\sigma 1$  outer capsid protein. The tagged viruses obtained were infectious, produce plaques of similar size, and could be easily propagated at high titers. However, attempts to introduce a 750 nucleotides-long sequence failed, even when it was added after the stop codon, suggesting a possible size limitation at the nucleic acid level.

*Keywords:* Reovirus; Reverse genetics; Tag; Epitope

## 3.1. Introduction

Mammalian reovirus under the trademark “Reolysin®” (derived from reovirus serotype 3 Dearing: T3/Human/Ohio/Dearing/55) is presently under study as an “oncolytic” virus in various clinical assays for the treatment of human cancers (recently reviewed in: Kelly et al., 2009; Lal et al., 2009; Thirukkumaran and Morris, 2009; Harrington et al., 2010). Reovirus is among the few viruses that can be used as an oncolytic agent without prior genetic engineering. Reovirus is only weakly pathogenic in human adults and its replication is blocked in “normal” cells while it is able to replicate in, propagate, and destroy transformed/cancer cells; this is apparently due to the presence of an activated Ras oncogenic pathway in these cells. Direct or indirect activation of the Ras signalling pathway appears to increase viral uncoating, repress innate immunity and/or augment viral-induced apoptosis, resulting in the natural oncolytic activity of the virus (Alain et al., 2007;

Marcato et al., 2007; Rudd and Lemay, 2005; Shmulevitz et al., 2010; Smakman et al., 2005; Strong et al., 1998).

The reovirus capsid is made of two concentric layers of proteins; the trimeric  $\sigma 1$  protein is exposed at the surface of the virion and binds onto target cells; the carboxyl-terminal globular domain being most exposed and responsible for high-affinity binding to the main cellular receptor, JAM-A. Reovirus virions enter cells by endocytosis and are partially uncoated before being released to the cytoplasm; in contrast, extracellular proteases can partially uncoat the virions to infectious subviral particles (ISVPs) that still harbor  $\sigma 1$  at their surface but that directly cross the plasma membrane to enter the cytoplasm where viral replication ensues (Danthi et al., 2010).

Despite its natural oncolytic ability, it is likely that reovirus binding onto normal cells via ubiquitous receptors such as sialic acid, JAM-A, and other unidentified receptor(s) (Antar et al., 2009; Coyne, 2009) will limit efficiency of the virus to reach some target cells in the organism. There are also some evidence to suggest that the virus receptors on the cell surface are either absent, or “masked” in some in some human cancer cell types, such as colorectal cancer cells (van Houdt et al., 2008). Finally, even though the virus appears to be only weakly pathogenic in humans, it cannot be excluded totally that some individuals, especially younger or immunodeficient patients, could develop disease due to reovirus inoculation, especially after systemic (intravenous) administration. Although its involvement in human biliary atresia of the newborn remains to be proven more conclusively, a significantly higher prevalence of reovirus RNA was detected in hepatic tissues from diseased individuals compared to normal controls (Tyler et al., 1998). Given strains of reovirus were also shown to induce liver pathologies that are reminiscent of biliary atresia in a murine experimental model (Parashar, Tarlow, and McCrae, 1992; Forrest and Dermody, 2003). The virus was also shown to induce “black foot syndrome” in immunodeficient SCID/NOD mice (Loken et al., 2004). There are thus possibly important benefits in the development of reovirus strains that are either attenuated (Kim et al., 2011) or targeted to bind specifically onto given cancer cell types, as proposed by others (Van Den Wollenberg et al., 2009). This last approach is currently under study for various

oncolytic viruses such as adenovirus, measles virus, and herpesvirus, among others (Blechacz and Russell, 2008; Mathis, Stoff-Khalili and Curiel, 2005; Campadelli-Fiume et al., 2011).

Until recently, it was not possible to modify the genome of reovirus, using the so-called “reverse genetics” approach that has been so widely used to study viruses belonging to most virus families. Nevertheless, a small 6-amino acids long peptide was added to the extreme carboxyl-terminal end of  $\sigma 1$  using an experimental approach in which cells are transfected with the plasmid encoding the tagged protein and then infected with a wild type virus to select recombinant viruses (van den Wollenberg et al., 2008). This strategy appears quite complex and requires an adequate cell line for the selection procedure.

A plasmid-based reverse genetics system was more recently described for mammalian reovirus by the group of Dr Terence Dermody (Kobayashi et al., 2007; reviewed by: Lemay, 2011); this novel approach was used by this group to study various reovirus mutants obtained by site-directed mutagenesis (see for example: Boehme, Guglielmi and Dermody, 2009; Danthi et al., 2008a; Danthi et al., 2008b; Kobayashi et al., 2007; Kobayashi et al., 2009), or to substitute a whole gene segment from one reovirus serotype to the other (Kobayashi et al., 2007; Zurney et al., 2009).

In the present study, the usefulness of the plasmid-based reverse genetics approach was further established by adding different epitope tags at the carboxyl-terminal end of  $\sigma 1$ . Viruses harbouring up to a 40 amino acids long peptide were readily recovered. However, infectious viruses could not be recovered when the sequence encoding the yellow fluorescent protein was fused to  $\sigma 1$ , even when a stop codon was introduced to avoid the production of a fusion protein. This suggests the possible existence of a size limitation of exogenous sequences that can be added at the nucleic acid level, independently of protein structure or function.

## **3.2. Materials and methods**

### **3.2.1. Cells and viruses**

L929 cells and Vero cells were originally obtained from the American Type Culture Collection and were used for reovirus propagation and titration; BHK21 cells stably expressing the T7 RNA polymerase (Buchholz, Finke, and Conzelmann, 1999) were a generous gift from Dr John Hiscott (Lady Davis Research Institute, Montréal, Canada). All these cells were grown in minimal Eagle medium (MEM; Wisent) containing 5% fetal bovine serum (FBS Gold, PAA laboratories).

### **3.2.2. Antibodies**

Hybridoma cell lines producing either anti- $\sigma 3$  (4F2) or anti- $\mu 1$  (10F6) have been described before (Virgin et al., 1991) and were obtained from Dr Kevin Coombs (Department of Microbiology, University of Manitoba). These cells were grown in MEM for suspension culture with 10% fetal bovine serum, proline (20  $\mu\text{g/ml}$ ) and  $\beta$ -mercaptoethanol (50  $\mu\text{M}$ ); they were fed each 2 or 3 days to obtain cell concentration between  $2 \times 10^5$  and  $5 \times 10^5$  per ml, they were resuspended in fresh medium at a concentration of  $5 \times 10^5$  cells per ml and left until most cells were dead as judged by trypan blue exclusion; cells and debris were removed by centrifugation at low speed and supernatants containing the monoclonal antibodies were kept at 4 °C with 1mM sodium azide as preservative. The polyclonal antiserum directed against the carboxyl-terminal head domain of  $\sigma 1$  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 mouse anti-polyhistidine monoclonal antibody was obtained from Qiagen (Qiagen, Mississauga, Ont., mouse Penta-His antibody, Catalog #34660). The mouse anti-HA tag (12CA5) was from Berkeley Antibody Company (BabCO) and a generous gift from Dr Pierre Belhumeur (Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal). The rabbit anti-tubulin was obtained from ICN Biomedicals Inc.

### 3.2.3. Plasmid constructs

The plasmids harbouring separately each of the cDNA corresponding to the 10 genes of reovirus serotype 3 Dearing, under the transcriptional control of the T7 promoter, have been described (Kobayashi et al., 2007) and were obtained from Dr Terence Dermody (Vanderbilt University, Nashville, Tennessee). Medium scale plasmid DNA was column-purified using Qiagen plasmid midi kit and endotoxin-free buffers (Catalog #12243 and #19048), as recommended by the manufacturer. Concentration and purity were determined by measuring optical density using a nanodrop microspectrophotometer (ND-1000, Thermo Scientific). To insert sequence encoding for the hexahistidine or single HA tag at the end of the  $\sigma 1$ -encoding sequence, the corresponding plasmid was submitted to site-directed mutagenesis using the QuickChange® Lightning site-directed mutagenesis kit (Stratagene, Catalog #200518), as recommended by the manufacturer. In an additional construct, a unique *SpeI* site was introduced following the hexahistidine tag, just before the stop codon, thus adding two amino acids to the protein (a threonine and a serine); this was also done by site-directed mutagenesis using the plasmid encoding hexahistidine-tagged  $\sigma 1$ . This same plasmid was used to introduce 3 additional copies of the HA tag. The pMPY-3xHA plasmid (Schneider et al., 1995) was used as a template for PCR amplification of the 3HA-encoding region using oligonucleotides designed to introduce the *SpeI* site at both ends of the PCR product that was cloned thereafter at the *SpeI* site following the hexahistidine tag. The sequence encoding the enhanced yellow fluorescent protein was amplified from the pcDNA.1.eYFP.MCS(MB) plasmid (a generous gift from Dr Jacques Thibodeau) and also subcloned at the *SpeI* site. In a final construct, a stop codon was introduced by site-directed mutagenesis 3 amino acids after the beginning of the YFP-encoding sequence. The presence of the expected mutations or insertions, and absence of other changes in the adjacent region, was verified by sequencing the final plasmids on small-scale preparation of endotoxin-free plasmid DNA that was column-purified, as recommended by the manufacturer (Zyppy plasmid miniprep kit, Zymo Research). The different

oligonucleotides used as primers for mutagenesis, PCR and sequencing are presented in Table I.

#### **3.2.4. Recovery of infectious viruses by plasmid-based reverse genetics**

Recovery of infectious reovirus stocks was done using a modification of the original procedure (Kobayashi et al., 2007). The nine wild-type plasmids, prepared as medium scale preparations, were simultaneously introduced with the plasmid encoding the tagged  $\sigma 1$ ; transfection was done using Fugene 6 (Roche), as recommended by the manufacturer. Approximately 0.10  $\mu$ g of each plasmid was used to transfect semi-confluent 35mm-diameter petri dish of BHK21 cells that express the T7 RNA polymerase. The medium was recovered 3-4 days later, cells were trypsinized and plated in a 100 mm-diameter petri dish with the medium recovered previously and completed with 9 ml of complete medium containing 5% heat-inactivated fetal bovine serum. Two-third of the medium was replaced with fresh medium, 3 days later, and incubated for another 4 days before being frozen at -80 °C and used as starting virus stocks. Virus clones were recovered from single plaques obtained on Vero cells in the presence of chymotrypsin; plaques were visualized directly by phase contrast microscopy without staining. The clones were amplified on Vero cells in the presence of chymotrypsin, titrated, and further propagated on L929 cells at an approximate MOI of one PFU/cell before being titrated again.

#### **3.2.5. Plaque assay**

Plaque assay was done using a modification of standard procedures. Briefly, Vero cells were plated in 6-wells plates, 24 before infection, in order to obtain confluent monolayers at the time of infection. After medium removal and washing with serum-free medium, serial tenfold dilutions of the virus samples were applied in minimal volume (250  $\mu$ l) in each well. Cells were left at 4 °C for one hour with gentle agitation each 15 minutes. Plates were briefly warmed at 37 °C; 2.5 ml of 1% agar (bacto-agar, Difco) in serum-free medium 199 (prepared by mixing a 2% sterile agar solution with medium prepared at twice

the normal concentration) was added to each well. The sterilized 2% agar solution was melted before in a microwave oven and kept at 45 °C and mixed with the medium that was incubated at the same temperature before addition of 10µg/ml of chymotrypsin (Sigma Sigma Type I-S from bovine pancreas; prepared at 10mg/ml in 1mM HCl and kept frozen in aliquots). After the agar overlay has hardened (a few minutes at room temperature), plates were incubated for different periods of time (4 to 5 days in routine titration assay). The cells were fixed by adding 2 ml of 10% formaldehyde (in PBS) to each of the wells. After one hour at room temperature, the formaldehyde solution and the agar overlay were removed before adding 1 ml of 1% crystal violet (in 70% methanol). After 60 minutes, the staining solution was removed and the plates were washed in tap water before being air-dried. Plaque formation for recovery of infectious virus was performed similarly except that the plaques were identified directly by phase contrast microscopy using an inverted microscope. Individual plaques were picked with 1 ml sterile pipette tips, transferred in 1 ml of sterile medium and virus left to diffuse for at least 24 hours at 4°C.

### **3.2.6. Sequencing of S1 viral genome segment**

To verify that the sequences added were actually conserved in the final virus stocks obtained by reverse genetics, sequencing was done by RT-PCR amplification on the viral genome followed by direct sequencing of the PCR product. Virus stocks were used to infect L929 cells in 10 cm-diameter petri dishes at a MOI of 1 PFU/cell. Cells and medium were recovered at 24-30 hours 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 15 min of centrifugation at 7,500 rpm at 4 °C in a Sorvall SS34 rotor (in Corex 15 ml tubes), supernatant was recovered and overlaid on a 1 ml cesium chloride cushion at a density of 1.3 g/ml for ultracentrifugation in a 70.1Ti rotor at 50,000 rpm for one hour at 4 °C. Virus pellet was recovered in 400 µl of TEN buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 250 mM NaCl) before addition of 0.25% 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 on both strand of the double-stranded RNA was done with MLV reverse transcriptase, as recommended by the manufacturer (Roche) using one-fourth of the RNA and oligonucleotides specific for each strand at the ends of the gene (Table I). One-fifth of the reverse transcriptase reaction was then used in a PCR reaction with the same two oligonucleotides for 35 cycles using the FastStart protocol (Roche). The PCR fragment was then purified using Qiaquick PCR purification kit (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.

### **3.2.7. Immunoblotting**

Infected cells were recovered by scraping in 500 µl of medium and centrifuged in an Eppendorf tube at 1000 rpm for 30 seconds at 4 °C. Cell pellets corresponding to a 60 mm-diameter petri dish were resuspended in 100 µl of Tris-HCl 10 mM pH 7.5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40 and left on ice for 10 minutes before centrifugation at maximum speed for 5 minutes in an Eppendorf centrifuge at 4 °C. Proteins were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting. Nitrocellulose membrane was blocked with 2% non-fat dry milk (Biorad) in TBS (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, 150 mM NaCl) and sequentially incubated for one hour at room temperature with the primary antibody. When using monoclonal antibodies from tissue culture medium, these 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. Other primary antibodies were diluted in PBS containing 1% bovine serum albumin and sodium azide at either a 1/500 dilution for the anti-σ1 antibody or at the dilution recommended by the manufacturer for the other antibodies. Membranes were washed in TBS containing 1% Tween-20. Revelation was done using peroxylase-conjugated secondary antibody and chemiluminescent substrate as recommended by the manufacturer (Pierce SuperSignal

West Dura Extended Duration Substrate). Images were obtained on Kodak BioMax Light Film.

### 3.3. Results

#### 3.3.1 Rationale

As a proof of principle for the utilisation of the plasmid-based reverse genetics approach for addition of exogenous epitope to the reovirus outer capsid, two different small epitopes were first examined for their ability to be added at the carboxyl-terminal end of  $\sigma 1$ . This position was chosen since, in one study, an hexahistidine tag was already reported to be functional at this position (van den Wollenberg et al., 2008). Also, when a chimeric protein between the adenovirus fiber protein and  $\sigma 1$  is added to adenovirus virions, the presence of both hexahistidine and myc tag at its carboxyl-terminal end still allowed cell binding by the  $\sigma 1$  moiety (Mercier et al., 2004; Schagen et al., 2006; Tsuruta et al., 2005; 2007). In the present study, the hexahistidine tag (6H) was first used and, as a further proof that different epitopes can be accommodated at this position, the more complex HA epitope, YPYDVPDYA (Kolodziej and Young, 1991; Wilson et al., 1984), was examined in parallel (Fig. 1A).

Analysis of the  $\sigma 1$  crystallographic structure (Chappell et al., 2002) (PDB 1KKE) revealed that the peptide epitope should be presented at the external surface of each molecule of the trimeric structure (Fig. 1B), at the basis of the globular structure involved in binding to cellular protein JAM-A, acting as the main receptor for the virus (Fig 1C) (reviewed in Schelling et al., 2008). However, the tag will be located away from the known region of interaction between  $\sigma 1$  and JAM-A (Kirchner et al., 2008)( PDB 3EOY) and should not preclude this interaction.

### **3.3.2. Introduction of an epitope-encoding sequences before the stop codon in the S1 gene**

To insert tag-encoding sequence in the  $\sigma 1$ -encoding gene, the corresponding plasmid harbouring the type3 Dearing S1 gene under the control of the T7 polymerase was directly submitted to insertional site-directed mutagenesis, as described in Materials and Methods. Infectious virus was recovered using transfection of BHK cells expressing the T7 RNA polymerase (Buchholz et al., 1999). These cells were used as described by others (Kobayashi et al., 2010) in replacement of a vaccinia virus vector expressing the T7 polymerase originally used for plasmid-based reovirus reverse genetics (Kobayashi et al., 2007). Viruses were recovered from single plaques and propagated, as described in Materials and Methods.

The plaque assay procedure, modified to include chymotrypsin in the agar overlay, was adapted to Vero cells. This facilitated the recovery of the plaques that were readily visualized on these cells by direct visual inspection or by phase contrast microscopy. However, the addition of chymotrypsin was necessary to obtain visible plaques (data not shown), consistent with a previous report that proteolytic uncoating is a limiting step for reovirus infection in these cells (Golden et al., 2002). Vero cells could eventually be an useful alternative to L929 cells to recover certain virus mutants since these cells are defective in interferon production (Desmyter et al., 1968; Emeny and Morgan, 1979).

As shown in figure 2, plaque size was comparable at either 2 or 4 days post-infection with either viruses. Only small plaques were observed at 48 hours for all viruses, although foci of infected cells could be detected by phase-contrast microscopy (data not shown). At 96 hours, plaques were readily visualized in all cases, even before staining. Final plaque size was apparently slightly increased for the HA-tagged virus, but the significance of this observation was not further examined.

### **3.3.3. Sequencing the S1 gene of viral clones harbouring exogenous epitope**

Virus stocks were then used to infect L929 cells and genomic RNA was extracted from viral particles. The nucleotide sequence of the gene was verified by RT-PCR to ensure that the sequence encoding the tag was maintained without any other changes to the coding sequence. Six different clones of the 6H-tagged virus and 5 different clones of the HA-tagged virus were examined. In each case, the sequence encoding the tag was retained by the virus. Except in one virus with the 6H-tag, harboring a glutamine to leucine amino acid substitution at position 51, there was no other change compared to the initial sequence of the cloned S1 gene (data not shown).

### **3.3.4. Expression of tagged $\sigma 1$ in infected cells**

Virus stocks encoding either Wt or tagged  $\sigma 1$  were then used to infect L929 cells and proteins were recovered for immunoblotting. The two different tagged  $\sigma 1$  appeared to be accumulated to similar levels as the Wt protein under these conditions, as judged by immunoblotting using a polyclonal antibody specific to the globular head of the protein (Fig. 3A). When monoclonal antibodies specific to either the 6H or HA tag were used (Fig. 3B and 3C, as indicated), the  $\sigma 1$  protein was easily detected, and only in cells infected with the respective virus. A small change in electrophoretic mobility was also noticed for the tagged proteins, as expected. Since there was no apparent secondary band of a mobility corresponding to the untagged protein when the anti- $\sigma 1$  polyclonal antibody was used, it is most likely that the tag is stably retained on all copies of the protein and that  $\sigma 1$  moieties incorporated to the viral particles are also harbouring the tag.

Immunoblotting of the same samples to detect the two major outer capsid proteins  $\sigma 3$  and  $\mu 1$  revealed similar amount of these proteins (Fig. 3D), with a similar ratio of the different  $\sigma 1$  proteins compared to the other major outer capsid proteins.

### 3.3.5. Addition of longer peptide sequences at the carboxyl-terminal end of $\sigma 1$

Having demonstrated that it is possible to introduce exogenous genetic material encoding an exogenous peptide fused to the carboxyl-terminal end of  $\sigma 1$ , a plasmid construct was made that encodes the 6H tag followed by a single *SpeI* site, in order to facilitate insertion of additional genetic material to determine the limitations in size and/or complexity that can be added at this position. A 96 nucleotide sequence, corresponding to three consecutive copies of the HA tag, separated by a few amino acids (Fig. 1B) was recovered by PCR from an adequate plasmid and subcloned at the unique *SpeI* site, as described in Materials and Methods. Again, virus was easily recovered and formed plaques of similar size as the virus harbouring a single copy of HA (Fig 2). Immunoblotting analysis confirmed the presence of both the 6H and HA tags on the protein (Fig. 3B and 3C) and similar levels of the  $\sigma 1$  and  $\mu 1$  proteins (Fig. 3A and 3D).

In order to determine if very long sequences can be successfully added at the same position, the coding sequence for the enhanced yellow fluorescent protein (239 amino acids) was amplified by PCR from a plasmid construct and introduced at the *SpeI* site to make a fusion protein with  $\sigma 1$  (Fig. 1A). To verify if the efficiency of virus recovery will be affected if only the nucleotide sequence is present, without actual fusion at the protein level, this construct was then subjected to site-directed mutagenesis to introduce a premature stop codon 3 amino acids after the beginning of the YFP-encoding sequence (Fig. 1A). However, despite numerous attempts, it was not possible to recover viruses with either of these two plasmid constructs.

### 3.3.6. Further characterization of tagged viruses

In order to further establish the replicative potential of the tagged viruses, the kinetics of production of infectious virus following infection of L929 cells at a low multiplicity of infection were measured by viral titration (Fig. 4). All three tagged viruses behave similarly and replicative kinetics were somewhat delayed compared to Wt virus,

although final titers were only reduced less than tenfold (Fig. 4 and data not shown). When virus binding at the cell surface was compared using a newly developed FACS-based assay, binding was reduced for all three tagged viruses, either as virions or ISVPs, compared to the wild type virus (data not shown). It was not established if this is due to reduced incorporation of tagged  $\sigma 1$  to the virions or reduced affinity of the  $\sigma 1$  for its cellular receptors due to partial interference by the tag.

### 3.4. Discussion

Before the present work was undertaken, it had been reported that a small 6H tag could be added to the carboxyl-terminal end of  $\sigma 1$  (van den Wollenberg et al., 2008). In this previous study, “recombinant” viruses were selected for their ability to bind and replicate solely in cells engineered to express an artificial cell surface receptor made of a single-chain antibody against the tag. The mechanism allowing the recovery of the tagged encoding sequence in a viral RNA with authentic 5' and 3' untranslated regions remains unknown. In these viruses, additional amino acids changes were however “selected” in the tagged  $\sigma 1$  protein compared to the original protein but this was not observed in the present study using the more direct plasmid-based reverse genetics approach. The only other amino acid substitution obtained was found in only one randomly-picked plaques and close to the amino-terminal end, and thus far from the carboxy-terminal tag position. The requirement for a co-infecting virus in the previous approach suggests that the virus stock used contained viruses whose sequence differed from the consensus and this is later reflected in the sequence of viruses from randomly picked plaques. Clearly, when direct plasmid-based reverse genetics is used to incorporate the exogenous sequence, there is no requirement for such “second-site” mutations; furthermore, the reverse genetics approach is obviously more direct and does not require a special cell line for selecting the novel viruses.

The carboxyl-terminal end of  $\sigma 1$  thus appears ideally suited to pursue the idea of adding additional peptide at the surface of the reovirus particles. The question is not trivial since other attempts to add exogenous epitopes on other viral proteins had little success

(Rouault and Lemay, 2003; Lemay, 2011; Lemay, unpublished data). The limits in length that could be accepted at the carboxyl-terminal end of  $\sigma 1$  while maintaining the infectious potential of the viral particle remains to be determined. The longest tagged  $\sigma 1$  with its triple HA tag has a total of 40 additional amino acids (Fig. 1A). The construct encoding the hexahistidine epitope followed by a unique *SpeI* restriction will facilitate further work to determine the limitations in size that can be added without affecting viral replication too strongly. The presence of the 6H tag could play the role of a linker to facilitate insertion of additional amino acids at this position. The addition of even the smallest tag does affect virus binding to a certain extent, although this remains acceptable for most applications; however, it may prove difficult to add much longer and complex peptides without further, and more drastic, consequences on virus infectivity.

In addition to possible consequences of amino acids addition on the protein itself, the importance of nucleotide sequence and structure at both termini are likely of importance in allowing transcription, replication and encapsidation of RNA genomic segments.

In conclusion, additional genetic material could be added to the genome of a replication-competent reovirus using plasmid-based reverse genetics, and up to at least 120 nucleotides can be added before the authentic 3' untranslated region of S1. In addition, the ability to modulate reovirus' ability to replicate in different cell types, by addition of specific microRNA targets, could be also envisaged for reovirus. This could add to the specificity of viral infection toward specific cell types and could make safer viruses for use as virotherapy agents, as currently investigated for other oncolytic viruses (reviewed in Bell and Kirn, 2008; Kelly et al., 2008). The plasmid-based reverse genetics for the addition of exogenous nucleic acids sequence to the viral genome and/or peptide sequences to viral proteins thus opens novel fields of investigation and applications for mammalian reoviruses as virotherapy agents.

### 3.5 Acknowledgments

This work was supported by a NSERC discovery grant to G.L. V.B.-L. was the recipient of a studentship from the “Fondation Gabriel Marquis” of Université de Montréal. We thank Véronique Sandekian for her help with some experiments and for numerous discussions.

### 3.6 References

- 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. *Mol. Ther.* 15, 1512-1521.
- Antar, A.A., 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 Microbe* 5, 59-71.
- Bell, J.C., Kim, D., 2008. MicroRNAs fine-tune oncolytic viruses. *Nat. Biotechnol.* 26, 1346-1348.
- Blechacz, B., Russell, S.J., 2008. Measles virus as an oncolytic vector platform. *Curr. Gene Ther.* 8, 162-175.
- Boehme, K.W., Guglielmi, K.M., Dermody, T.S., 2009. Reovirus nonstructural protein sigma1s is required for establishment of viremia and systemic dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 19986-19991.
- 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.
- Campadelli-Fiume, G., De Giovanni, C., Gatta, V., Nanni, P., Lollini, P.-L., Menotti, L., 2011. Rethinking herpes simplex virus: the way to oncolytic agents. *Rev. Med. Virol.* May 27. doi: 10.1002/rmv.691. [Epub ahead of print]

- Chappell, J.D., Protta, A.E., Dermody, T.S., Stehle, T., 2002. Crystal structure of reovirus attachment protein sigma1 reveals evolutionary relationship to adenovirus fiber. *EMBO J.* 21, 1-11.
- Coyne, C.B., 2009. The distinct roles of JAM-A in reovirus pathogenesis. *Cell Host Microbe* 5, 3-5.
- Danthi, P., Coffey, C.M., Parker, J.S., Abel, T.W., Dermody, T.S., 2008a. Independent regulation of reovirus membrane penetration and apoptosis by the mu1 phi domain. *PLoS Pathog.* 4, e1000248.
- Danthi, P., Kobayashi, T., Holm, G.H., Hansberger, M.W., Abel, T.W., Dermody, T.S., 2008b. Reovirus apoptosis and virulence are regulated by host cell membrane penetration efficiency. *J. Virol.* 82, 161-172.
- 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.
- 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.
- 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.
- Forrest, J.C., Dermody, T.S., 2003. Reovirus receptors and pathogenesis. *J. Virol.* 77, 9109-9115.
- 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.
- 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.

- Kelly, E.J., Hadac, E.M., Greiner, S., Russell, S.J., 2008. Engineering microRNA responsiveness to decrease virus pathogenicity. *Nat. Med.* 14, 1278-1283.
- 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.K., Johnston, R.N., 2011. Attenuated reovirus displays oncolysis with reduced host toxicity. *Br. J. Cancer* 104, 290-299.
- Kirchner, E., Guglielmi, K.M., Strauss, H.M., Dermody, T.S., Stehle, T., 2008. Structure of reovirus sigma1 in complex with its receptor junctional adhesion molecule-A. *PLoS Pathog.* 4, e1000235.
- Kobayashi, T., Antar, A.A., Boehme, K.W., Danthi, P., Eby, E.A., Guglielmi, K.M., Holm, G.H., Johnson, E.M., Maginnis, M.S., Naik, S., Skelton, W.B., Wetzell, J.D., Wilson, G.J., Chappell, J.D., Dermody, T.S., 2007. A plasmid-based reverse genetics system for animal double-stranded RNA viruses. *Cell Host Microbe* 1, 147-157.
- Kobayashi, T., Ooms, L.S., Chappell, J.D., Dermody, T.S., 2009. Identification of functional domains in reovirus replication proteins muNS and mu2. *J. Virol.* 83, 2892-2906.
- 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.
- Kolodziej, P.A., Young, R.A., 1991. Epitope tagging and protein surveillance. *Meth. Enzymol.* 194, 508-519.
- Lal, R., Harris, D., Postel-Vinay, S., de Bono, J., 2009. Reovirus: Rationale and clinical trial update. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 11, 532-539.
- Lemay, G., 2011. La génétique inverse dans l'étude des réovirus: Progrès, obstacles et développements futurs. *Virologie* 15, 53-62.
- Loken, S.D., Norman, K., Hirasawa, K., Nodwell, M., Lester, W.M., 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.

- 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, 1522-1530.
- Mathis, J.M., Stoff-Khalili, M.A., Curiel, D.T., 2005. Oncolytic adenoviruses - selective retargeting to tumor cells. *Oncogene* 24, 7775-7791.
- Mercier, G.T., Campbell, J.A., Chappell, J.D., Stehle, T., Dermody, T.S., Barry, M.A., 2004. A chimeric adenovirus vector encoding reovirus attachment protein sigma1 targets cells expressing junctional adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 6188-6193.
- Middleton, J.K., Agosto, M.A., Severson, T.F., Yin, J., 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.
- Parashar, K., Tarlow, M.J., McCrae, M.A., 1992. Experimental reovirus type 3-induced murine biliary tract disease. *J. Pediatr. Surg.* 27, 843-847.
- Rouault, É., Lemay, G. 2003. Incorporation of epitope-tagged viral  $\sigma 3$  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, 1489-97.
- Schagen, F.H., Wensveen, F.M., Carette, J.E., Dermody, T.S., Gerritsen, W.R., van Beusechem, V.W., 2006. Genetic targeting of adenovirus vectors using a reovirus sigma1-based attachment protein. *Mol. Ther.* 13, 997-1005.
- 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, pp. 147-171.
- Schneider, B.L., Seufert, W., Steiner, B., Yang, Q.H., Futcher, A.B., 1995. Use of polymerase chain reaction epitope tagging for protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 11, 1265-1274.

- 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 Res.* 70, 4912-4921.
- Smakman, N., van den Wollenberg, D.J., Borel Rinkes, I.H., Hoeben, R.C., Kranenburg, O., 2005. Sensitization to apoptosis underlies KrasD12-dependent oncolysis of murine C26 colorectal carcinoma cells by reovirus T3D. *J. Virol.* 79, 14981-14985.
- Strong, J.E., Coffey, M.C., Tang, D., Sabinin, P., Lee, P.W., 1998. The molecular basis of viral oncolysis: usurpation of the Ras signaling pathway by reovirus. *EMBO J.* 17, 3351-3362.
- Thirukkumaran, C., Morris, D.G., 2009. Oncolytic viral therapy using reovirus. *Methods Mol. Biol.* 542, 607-634.
- Tsuruta, Y., Pereboeva, L., Glasgow, J.N., Luongo, C.L., Komarova, S., Kawakami, Y., Curiel, D.T., 2005. Reovirus fiber incorporated into adenovirus serotype 5 enhances infectivity via a CAR-independent pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335, 205-214.
- Tsuruta, Y., Pereboeva, L., Glasgow, J.N., Rein, D.T., Kawakami, Y., Alvarez, R.D., Rocconi, R.P., Siegal, G.P., Dent, P., Fisher, P.B., Curiel, D.T., 2007. A mosaic fiber adenovirus serotype 5 vector containing reovirus sigma 1 and adenovirus serotype 3 knob fibers increases transduction in an ovarian cancer ex vivo system via a coxsackie and adenovirus receptor-independent pathway. *Clin. Cancer Res.* 13, 2777-2783.
- Tyler, K.L., Sokol, R.J., Oberhaus, S.M., Le, M., Karrer, F.M., Narkewicz, M.R., Tyson, R.W., Murphy, J.R., Low, R., Brown, W.R., 1998. Detection of reovirus RNA in hepatobiliary tissues from patients with extrahepatic biliary atresia and choledochal cysts. *Hepatology* 27, 1475-1482.
- van den Wollenberg, D.J., van den Hengel, S.K., Dautzenberg, I.J., Cramer, S.J., Kranenburg, O., Hoeben, R.C., 2008. A strategy for genetic modification of the spike-encoding segment of human reovirus T3D for reovirus targeting. *Gene Ther.* 15, 1567-1578.

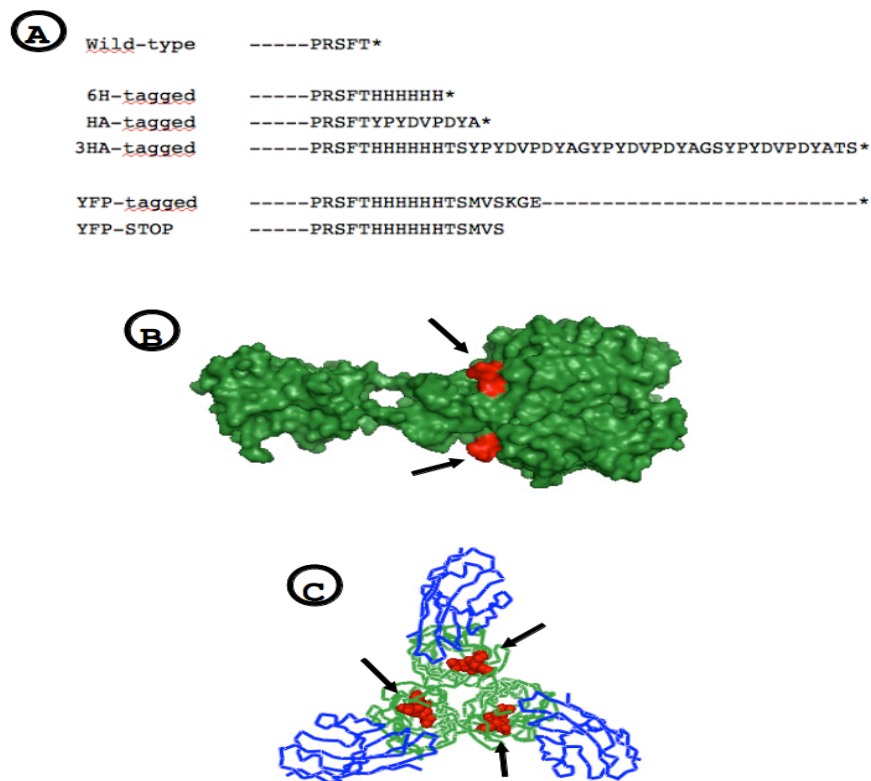
- Van Den Wollenberg, D.J., Van Den Hengel, S.K., Dautzenberg, I.J., Kranenburg, O., Hoebe, R.C., 2009. Modification of mammalian reoviruses for use as oncolytic agents. *Expert Opin. Biol. Ther.* 9, 1509-1520.
- van Houdt, W.J., Smakman, N., van den Wollenberg, D.J., Emmink, B.L., Veenendaal, L.M., van Diest, P.J., Hoebe, R.C., Borel Rinkes, I.H., 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.
- Wilson, I.A., Niman, H.L., Houghten, R.A., Cherenson, A.R., Connolly, M.L., Lerner, R.A., 1984. The structure of an antigenic determinant in a protein. *Cell* 37, 767-778.
- 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. *J. Virol.* 83, 2178-2187.

### 3.7 Tables and figures

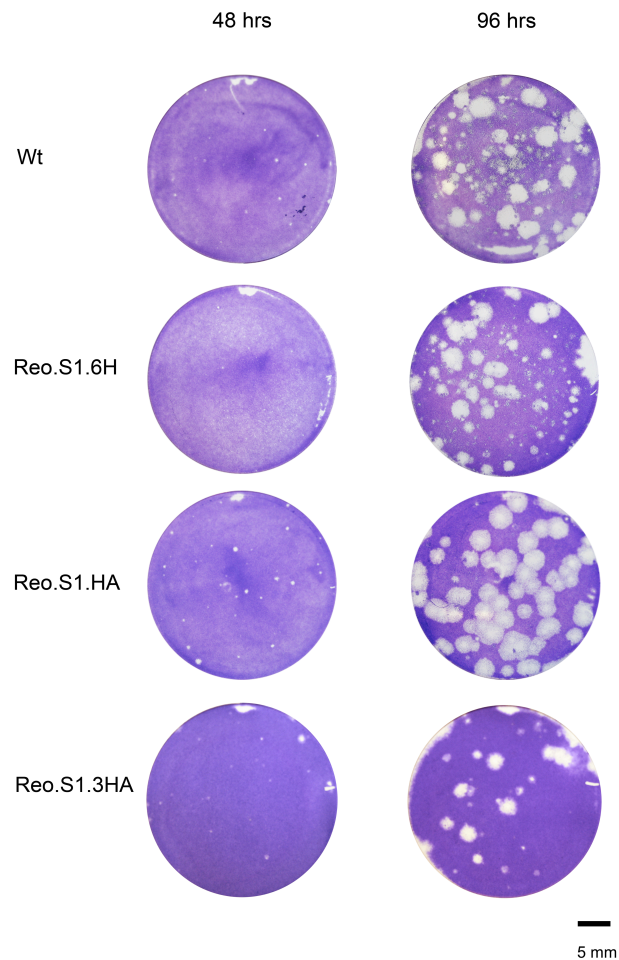
**Table I.** List of oligonucleotides used as primers in this study.

Use	Virus	Primer	Primer sequence*
Mutagenesis	REO.S1.6H	S1-6HIS	GCGTAGTTTCACG <u>CATCACCATCACCATCAC</u> TGAGGATCAGACCAC
		S1-6HIS-AS	GTGGTCTGATCCTCA <u>GTGATGGTGATGGTGA</u> <u>TGCGTGAAACTACGC</u>
Mutagenesis	Not determined	S1-SpeI	GCGTAGTTTCACG <u>CATCACCATCACCATCAC</u> <b>ACTAGT</b> TGAGGATCAGACCAC
		S1-SpeI-AS	GTGGTCTGATCCTCA <b>ACTAGT</b> <u>GTGATGGTG</u> <u>ATGGTGATG</u> CGTGAAACTACGC
Mutagenesis	Reo.S1.HA	S1-HA	GCGTAGTTTCACG <u>TACCCATACGACGTCCCA</u> <u>GACTACGCT</u> TGAGGATCAGACCAC
		S1-HA-AS	GTGGTCTGATCCTCA <u>AGCGTAGTCTGGGACG</u> <u>TCGTATGGGT</u> ACGTGAAACTACGC
Mutagenesis	Negative	S1-YFP-STOP	<b>CACACTAGT</b> <u>ATGGTGAGCTAGGGCGAGGAG</u> <u>CTGTTC</u>
		S1-YFP-STOP-AS	<u>GAACAGCTCCTCGCCCTAGCTCACCATACTA</u> <b>GTGTG</b>
PCR (3HA)	Reo.S1.3HA	S1-3HA-5'	CGGCCGC <b>ACTAGT</b> <u>TACCCATACG</u>
		S1-3HA-3'	<u>GGCCGCA</u> <b>ACTAGT</b> <u>AGCGTAATCTGG</u>
PCR (YFP)	Negative	YFP-Spe-5'	GCGCCG <b>ACTAGT</b> <u>ATGGTGAGCAAGGGCGAG</u> <u>CTGTTC</u>
		YFP-Spe-3'	CAGGAC <b>ACTAGT</b> <u>TTACTTGTACAGCTCGTCC</u> <u>ATGCCGAG</u>
RT-PCR		S1(1-15)	GCTATTGGTCGGATG
		S1(1416-1394)	AGTGCCGCGGGGTGGTCTGATC
Sequencing	S1(1-15)	S1(1-15)	GCTATTGGTCGGATG
		S1(708-730)	GACTCTCAAGACGACTGTGTTTG
		S1(917-940)	ATGTTAGCGGCGGTATCGGAATGA

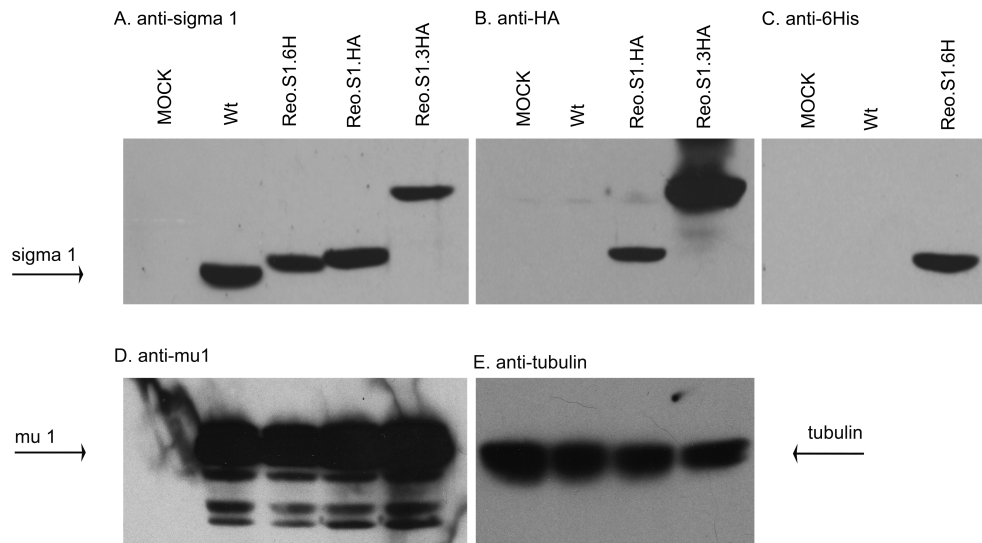
\*The SpeI site is indicated in red; the sequence encoding the 6His tag is indicated in green; sequences in blue are complementary to YFP-encoding sequence while purple sequences are complementary to sequences encoding the HA epitope.



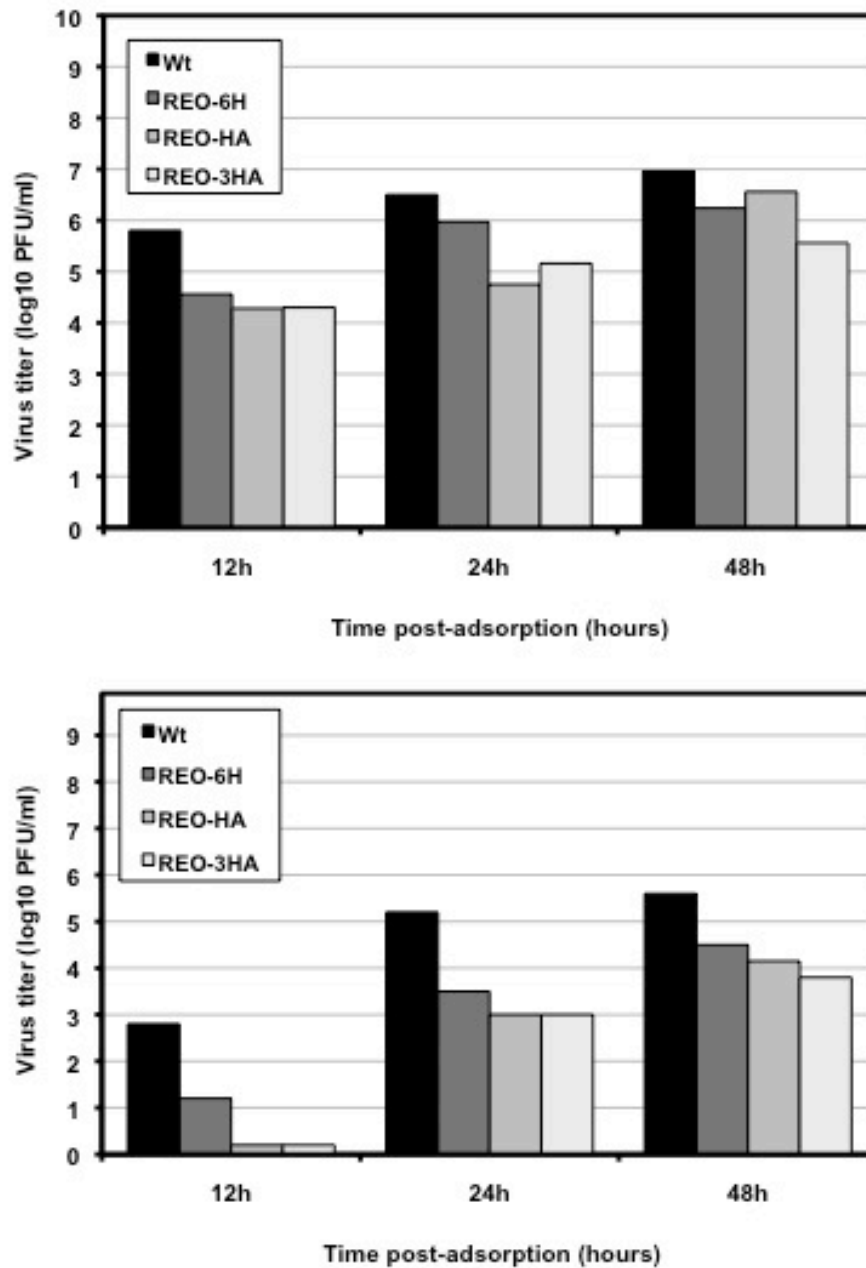
**Figure. 1.** Sequence and structure at the carboxyl-terminal end of tagged  $\sigma 1$  proteins. (A) Amino acids sequence at the carboxyl-terminal end of either the wild-type or the different tagged version of  $\sigma 1$  used in this manuscript. (B) Crystallographic structure (from PDB 1KKE) of the  $\sigma 1$  homotrimer viewed from the side with the arrow pointing at the position of the carboxyl-terminal amino acid illustrated as a sphere. (C) Crystallographic structure (from PDB 3EOY) of the complex between the  $\sigma 1$  homotrimer and the JAM-A cellular receptor viewed from the top of the structure with the arrow pointing at the position of the carboxyl-terminal amino acid illustrated as a sphere.



**Figure 2.** Plaque formation by the tagged viruses. Plaque assay was performed on Vero cells in the presence of chymotrypsin, as described in Materials and methods. A single well presenting well separated plaques are presented for the wild-type (wt), the hexahistidine-tagged (Reo.S1.6H), the HA-tagged (Reo.S1.HA) and the triple-HA tagged (Reo.S1.3HA) viruses. Cell monolayers were fixed and stained at either 48 or 96 hours post-infection, as described in Materials and Methods.



**Fig. 3.** Immunoblotting of viral proteins in cells infected with the tagged viral particles. Viral stocks of wild-type, 6H-tagged or HA-tagged were prepared and titrated as described in Materials and methods. Murine L929 cells were infected with these viruses at a multiplicity of infection of 2 PFU/cell. Proteins were recovered from infected cells 24 hours later and equivalent amounts were loaded on SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting. (A) The polyclonal monospecific anti- $\sigma 1$  head antibody, the monoclonal anti-HA antibody (B), or the monoclonal anti-hexahistidine antibody (C) were used, as indicated. (D) The membrane previously probed with the polyclonal monospecific anti- $\sigma 1$  head antibody was reprobed with monoclonal anti- $\mu 1$  antibody. (E) The membrane previously probed with the anti-HA antibody was reprobed with the anti-tubulin antibody.



**Figure 4.** Replication of tagged viruses. Wild-type or tagged viruses were used to infect L929 cells at a MOI of approximately 0.5 (upper panel) and 0.05 (lower panel) PFU/cell. Petri dishes of infected cells were recovered at 12, 24 or 48 hours post-infection and virus titration was performed by plaque assay, as described in Materials and Methods.

## **4. Étude de l'activité mucinolytique par la méthode de génétique inverse**

Le deuxième objectif de ce projet vise à entamer une caractérisation des virus issus de génétique inverse ayant subi des substitutions au niveau de leur site d'attachement aux acides sialiques ou des changements au niveau de l'activité mucinolytique. Dans un premier temps, les virus sont générés par l'utilisation de la technique de génétique inverse. Par la suite, ils sont caractérisés sur deux types cellulaires, soit les cellules L929 et les cellules MDCK.

### **4.1. La génération des substitutions**

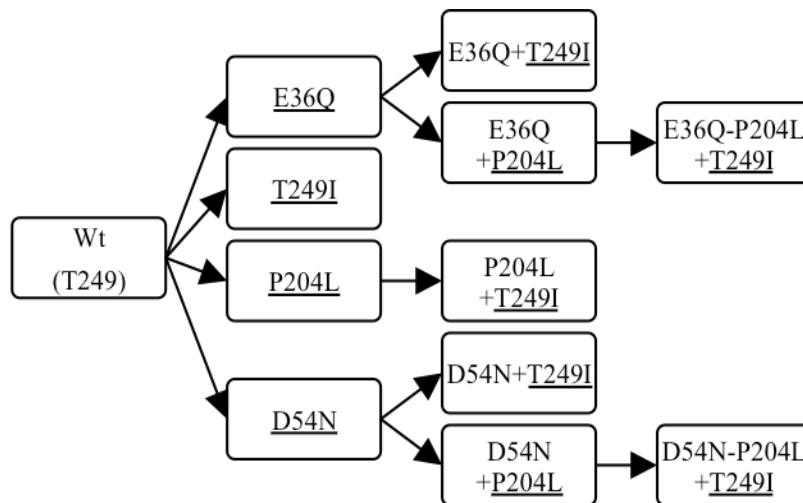
#### **4.1.1 Méthode**

Les plasmides pT7Bac-S1T3D et pT7-S2T3D, pT7-S3T3D, pT7-S4T3D, pT7-M1T3D, pT7-M2T3D, pT7-M3T3D, pT7-L1T3D, pT7-L2T3D et pT7-L3T3D sont amplifiés, extraits et purifiés (EndoFree® Plasmid Purification Handbook). L'identité des plasmides est confirmée par l'analyse des poids moléculaire à la suite de la migration sur gel d'agarose. La pureté et concentration des échantillons sont mesurées par spectrophotométrie (NanoDrop® ND-1000), variant entre 160 ng/μl et 600 ng/μl pour cette technique. Le plasmide pT7Bac-S1T3D est utilisé par la suite pour créer les mutants par mutagenèse dirigée (QuickChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis kit).

Deux séries de mutants sont engendrées par génétique inverse. Les virus de la première série possèdent une thréonine en position 249 tout comme le virus de type sauvage originalement utilisé pour la technique de génétique inverse (Kobayashi et al., 2007). Pour les virus de la deuxième série, la thréonine est substituée en isoleucine afin de pouvoir comparer les virus obtenus par génétique inverse au virus sauvage du laboratoire et à la majorité des isolats retrouvés dans la population. Les deux séries sont étudiées

séparément puisque cette substitution (T249I) restreint le scindement de la protéine  $\sigma 1$  en présence de trypsine et chymotrypsine (Chappell et al., 1998). Tel que présenté à la figure 10, cette substitution est ajoutée de façon successive aux autres.

Afin d'étudier l'importance du site d'activité mucinolytique en combinaison avec les sites d'attachement aux acides sialiques, plusieurs combinaisons de substitutions sont choisies. Par substitution du nucléotide correspondant sur l'amorce de PCR (tableau I), l'acide aminé est interverti par son acide aminé non chargé. Ainsi, pour les mutants d'activité catalytique, l'acide glutamique en position 36 devient une glutamine et l'acide aspartique en position 54 devient une asparagine. Le mutant d'attachement aux acides sialiques porte un changement de sa proline en position 204 pour une leucine.



**Figure 10.** Chronologie de la création des mutants. Tous les plasmides S1 mutants sont originaires du plasmide pT7BacS1-T3D sauvage, générant un total de douze virus différents. Les mutations sont ajoutées une à la fois et sont soulignées sur le diagramme.

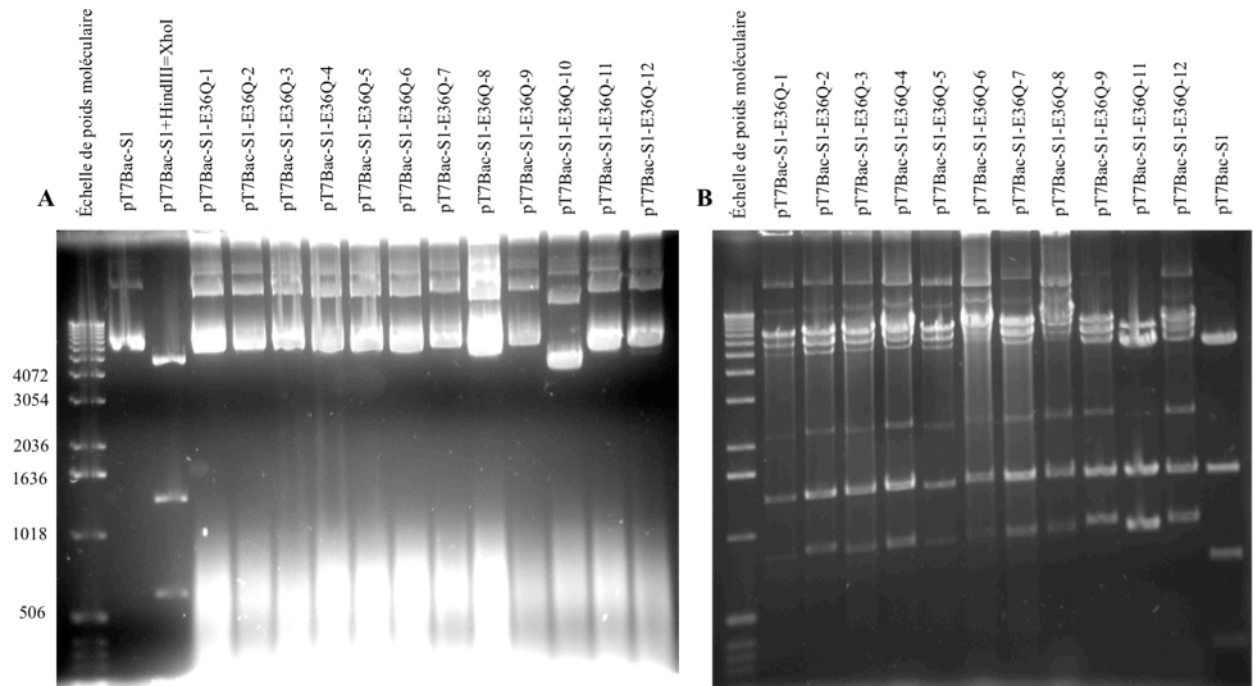
**Tableau II:** Amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée, le RT-PCR et l'analyse des séquences. Le nucléotide substitué est souligné.

Utilisation	Amorces	Virus	Séquence de l'amorce
Mutagenèse dirigée	C283G	REO.S1.E36Q	ATTTGAGACGTCTTCT <u>G</u> GAGCGCCGAGACC
	C283G-AS		GGTCTCGGCGCTC <u>C</u> AGAAGACGTCTCAAAT
	C1209T	REO.S1.D54N	CGATGATTTCGTTTGTTCATCAT <u>T</u> GAGTCCCTGGGTG
	C1209T-AS		CACCCAGGGACTC <u>A</u> ATGATGCAAACAAACGAATCATCG
	G758A	REO.S1.P204L	TTCAGACCCGTATTTCTC <u>T</u> AGCAATCGGATGGCG
	G758A-AS		CGCCATCCGATTGCT <u>I</u> AGGAAATACGGGTCTGAA
	G623A	REO.S1.T249I	CCACGTAACCTTTGCTCA <u>A</u> TTGCGCCTATCCTTGAG
	G623A-AS		CTCAAGGATAGGCGCAA <u>T</u> TGAGCAAAGTTACGTGG
RT-PCR	S1-1		GCTATTGGTCGGATG
	S1-1416		AGTGCCGCGGGGTGGTCTGATC
Analyse de séquences	S1-COOH		AAGGCTATGGCGGCGATTGTAGT

#### 4.1.2 Résultats

L'ajout de la substitution E36Q est confirmé une première fois par la digestion du plasmide avec les enzymes de restriction XhoI et HindIII. Effectivement, le changement de la guanine pour la cytosine (GAG→CAG) engendre la perte du site de clivage HindIII. Par conséquent, la perte des fragments de 650 pb et 200 pb est observée lors de la migration sur gel. Pour ce mutant, douze plasmides sont analysés. Le plasmide pT7Bac-S1-E36Q-10 semble porter une délétion et n'est pas conservé pour la suite du projet. Les onze autres semblent détenir la substitution souhaitée (figure 11). Seul le plasmide pT7Bac-S1-E36Q-11 est analysé par séquençage et est utilisé pour la suite du projet.

Les autres plasmides mutants sont engendrés par la même méthode. Notons que la séquence plasmidique est conservée, à l'exception de la substitution engendrée, pour tous les plasmides, même ceux subissant trois substitutions. Par exemple, le plasmide pT7Bac-S1-E36Q-P204L-T249I.



**Figure 11.** Digestion plasmidique des mutants pT7BacS1-E36Q. Migration sur gel d'agarose 1,4% des plasmides pT7BacS1-E36Q résultants de la mutagenèse dirigée. A.) Migration du plasmide sauvage pT7Bac-S1 en présence et absence des enzymes de restriction ainsi que des 12 mutants sélectionnés sans digestion enzymatique. B.) Digestion des 11 plasmides présélectionnés du mutant E36Q et du plasmide pT7Bac-S1 sauvage par les enzymes XhoI et HindIII. La présence de la substitution E36Q occasionne la perte des fragments de 650pb et 200pb.

## 4.2 Génération des virus

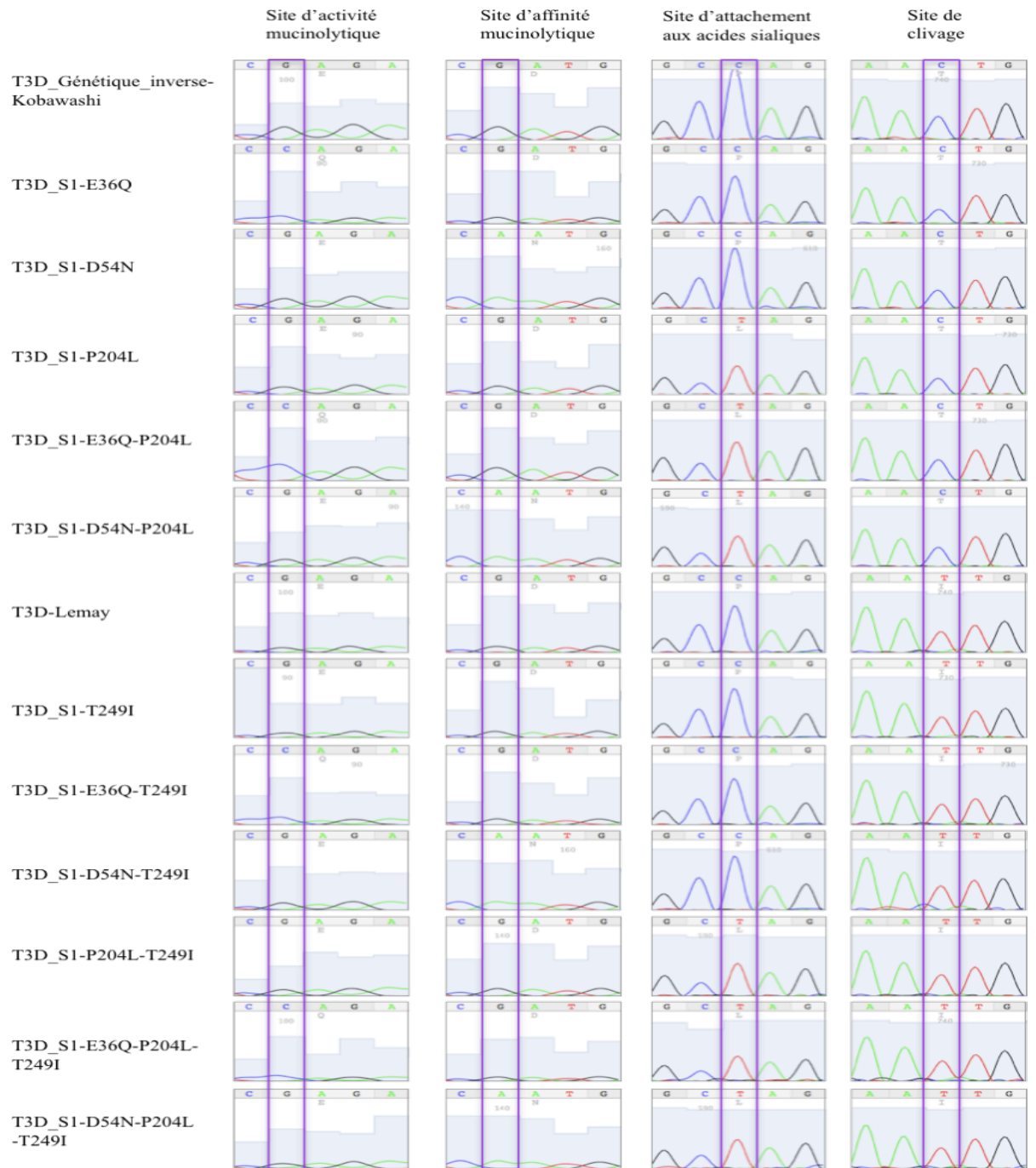
### 4.2.1 Méthode

Le virus est produit par transfection en cellules BHK-T7 de 100 ng d'ADN de chacun des 10 plasmides, soit pT7-S2T3D, pT7-S3T3D, pT7-S4T3D, pT7-M1T3D, pT7-M2T3D, pT7-M3T3D, pT7-L1T3D, pT7-L2T3D, pT7-L3T3D et le plasmide pT7BacS1 choisi. La présence du virus infectieux est confirmée par la présence de plaque de lyse sur

les cellules Vero en présence de chymotrypsine [15 ug/ml]. Après deux passage sur cellules L929, l'ARN virale est extraite par gradient de densité au Fréon, puis convertie en ADNc par RT-PCR. Le segment étudié est amplifié par PCR, puis analysé par séquençage. Une fois la substitution confirmée, le virus est amplifié une seconde fois sur cellules L929 à partir du stock de virus issus de la transfection en cellules BHK-T7. Pour chaque virus, un clone viral est sélectionné aléatoirement par le prélèvement d'une plaque de lyse. Celui-ci est amplifié par cinq passages en alternance sur cellules L929 et Vero, extrait et analysé par séquençage afin de confirmer que la substitution n'a pas réverté au fil des passages. Pour plus de détails, se référer au chapitre 3.

#### **4.2.2 Résultats**

Par cette méthode, les virus sont générés et récupérés. Tous les virus sont récupérés à partir de la propagation d'un seul clone. Celui-ci a été analysé par séquençage après la première amplification par passage ainsi qu'à la cinquième. Il est possible d'énoncer, suite à l'analyse des séquences virales issues du cinquième cycle, que la pression de sélection pour ces mutations est faible. En effet, aucun des onze mutants n'a réverté suite aux passages et il semblerait qu'aucune mutation complémentaire ne soit apparue (figure 12). Aussi, les titres viraux sont semblables pour chacun des virus, soit entre  $10^6$  et  $10^8$  UFP/ml.



**Figure 12.** Alignement de séquences des virus générés par génétique inverse. L'ADNc des virus générés par génétique inverse et du virus sauvage du laboratoire fut récupéré et analysé par séquençage. Un rectangle violet identifie le nucléotide interchangé.

## 4.3 Caractérisation de l'infection sur cellules L929

### 4.3.1 Méthode

Les virus récupérés sont titrés et analysés en fonction de leur infectivité sur deux types cellulaires, soit les cellules L929 et MDCK. Les fibroblastes de souris (L929) sont le type cellulaire habituellement utilisé pour la propagation de réovirus (Jackson & Muldoon, 1973). Les cellules MDCK sont des cellules épithéliales polarisées isolées d'un rein de chien, elles n'expriment pas la mucine. Les cellules MDCK transfectées pour exprimer la mucine 1 (MDCK-MUC1) ont été préalablement utilisées pour l'étude de l'effet mucinolytique de réovirus (Bisaillon et al., 1999).

La première caractérisation est exécutée sur les cellules L929, soit les mêmes cellules utilisées pour la propagation virale. Les cellules infectées pour une durée de 24h avec des virions ou ISVPs à MOI:0,05 sont récupérées, puis lysées. La réplication virale, démontrée par la quantité de protéines de T3D, est révélée par les anticorps anti- $\mu$ 1c et anti- $\sigma$ 3 (figure 13 et 14): référez à l'article "**Introduction of exogenous polypeptides on mammalian reovirus outer capsid using reverse genetics**" pour plus de détails concernant la méthode.

Le traitement à la neuraminidase permet l'hydrolyse de l'acide sialique à la surface cellulaire (type  $\alpha$ 2-3,  $\alpha$ 2-6 et  $\alpha$ 2-8). Elle consiste à effectuer un rinçage des cellules avec 1ml de milieu EMEM non supplémenté, puis les incubent à 37°C pendant deux heures dans une solution de 10 mU/ml de neuraminidase (*C. perfringens*, BioLabs) diluée en milieu EMEM. Ce traitement inhibe l'attachement du virus aux acides sialiques de la cellule.

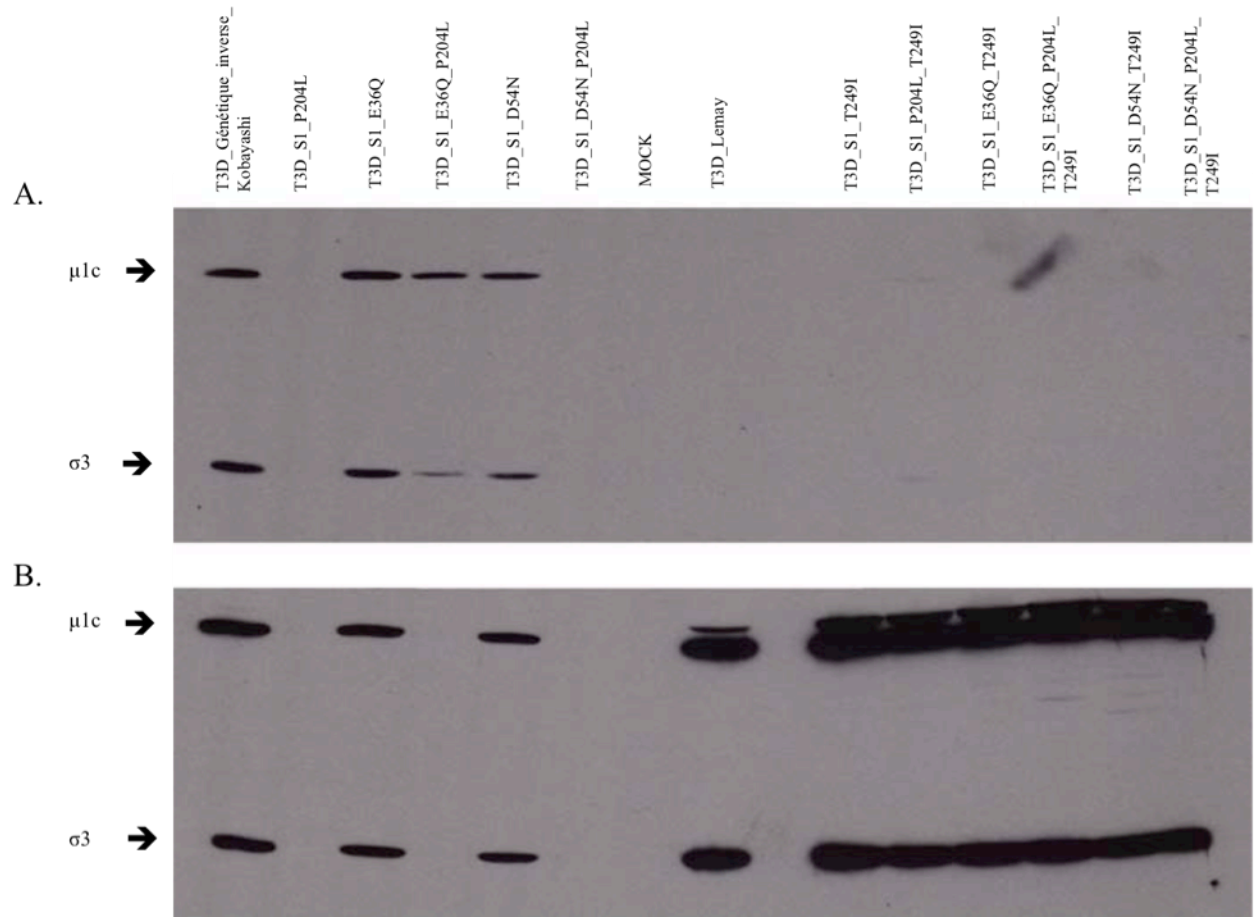
### 4.3.2 Résultats

Cette première expérience démontre bien, quoique de façon inattendue, un phénotype propre aux mutants créés. Ainsi, sous forme de virion, les virus portant la

substitution T249I engendrant une résistance à la chymotrypsine (non utilisée pour les virions) semblent peu ou pas infectieux alors qu'ils se répliquent bien sous forme d'ISVPs. Pourtant, ces virus ont été récupérés lors des passages viraux, et sont donc infectieux. Des expérimentations non montrées en ce présent ouvrage démontrent qu'une période d'incubation plus longue, permettant plus d'un cycle de réplication et/ou une MOI plus élevée (figure 14) permet de récupérer des virions portant la substitution T249I. Par contre, ces conditions ne permettent pas l'analyse des protéines virales contenues dans les cellules, puisque que dans ces conditions, la lyse cellulaire est déjà visible. Aussi, rappelons que le virus T3D\_Lemay porte la substitution T249I, mais que certaines mutations ont été identifiées sur le reste de son génome par rapport au virus T3D\_Génétique\_inverse\_kobayashi (Lemay, données non publiées). Il peut donc servir de contrôle, mais sous toute réserve.

De plus, les virions ne portant pas la substitution T249I semblent démontrer un phénotype différent, probablement propre aux substitutions d'attachement aux acides sialiques ou d'activité mucinolytique. Les virions portant la substitution P204L, un des sites d'attachement aux acides sialiques, semblent perdre leur infectivité. Par contre, il est surprenant de constater qu'en ajoutant à la première substitution P204L la substitution E36Q reliée au site de l'activité catalytique, le virion semble regagner de l'infectivité. Ce phénotype n'est pas visible lorsque l'infection se déroule avec le mutant T3D-S1-D54N ou avec des ISVPs. Aussi, les substitutions E36Q et D54N seules semblent n'avoir que peu ou pas d'effet sur l'infection de cellules n'exprimant pas la mucine.

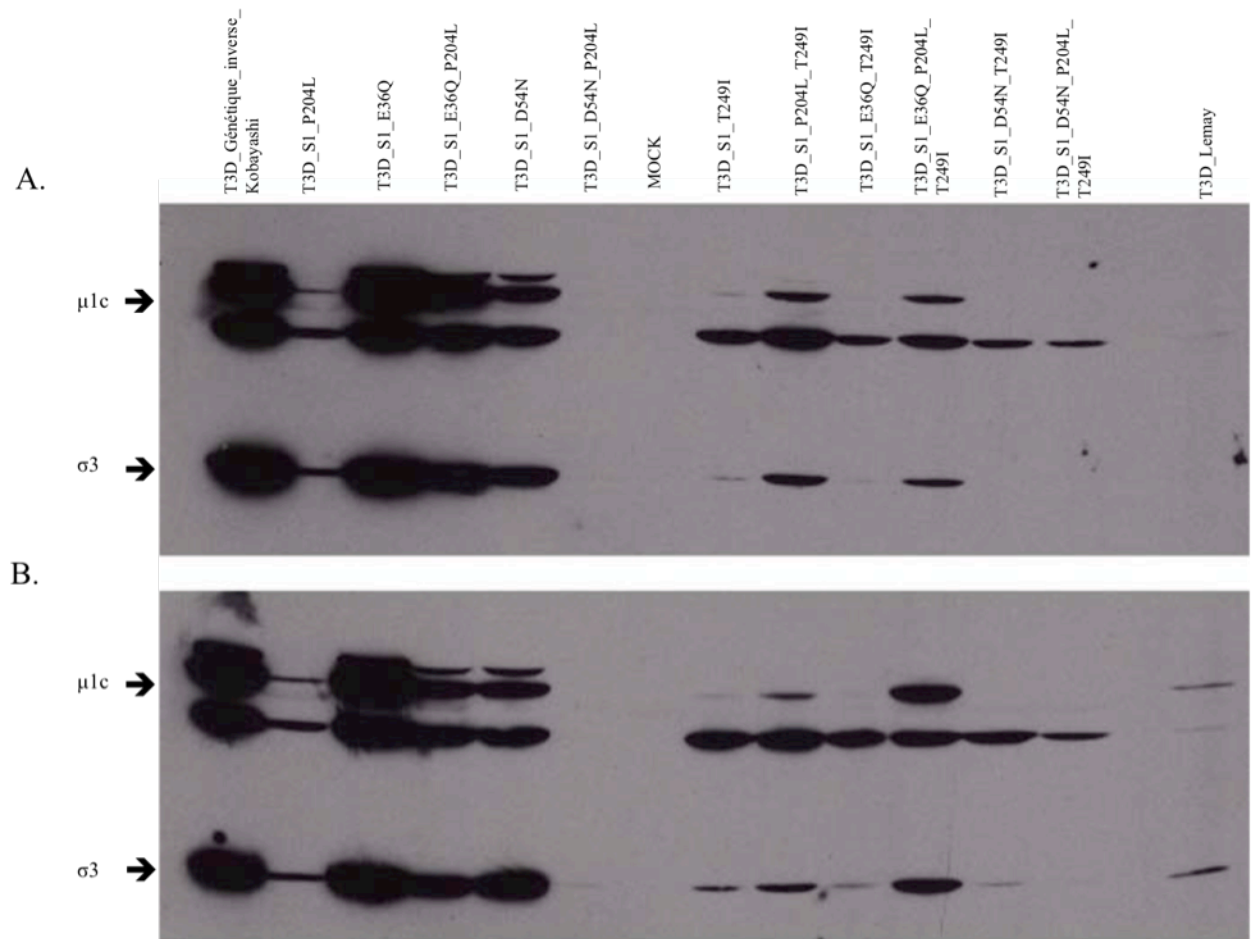
Sur la protéine  $\sigma 1$ , plusieurs sites ont été démontrés comme nécessaires à l'attachement du virus, soit les acides aminés 198, 202 et 204 (Chappell et al., 1997). Nous pensons que le phénotype observé pourrait être expliqué par un attachement résiduel à ces sites, malgré le fait que le site principal d'attachement 204 ne soit plus disponible pour cette fonction. Un essai d'infection sur cellules n'exprimant pas d'acides sialiques ou traitées à la neuraminidase permet de répondre à une telle question.



**Figure 13.** Immunobuvardage d'infection sur cellules L929.  $1,8 \times 10^6$  cellules L929 furent infectées avec tous les mutants sous forme de virions (A.) et ISVP (B.) à MOI=0,05 pendant 24h.

La même expérience est exécutée sur des cellules L929 traitées à la neuraminidase afin d'infirmer l'hypothèse que le phénotype observé est relié à un attachement aux acides sialiques par les autres sites non mutés. L'expérience fut conduite une première fois dans les mêmes conditions que l'infection sur cellules L929, mais le signal obtenu fut trop faible. Un deuxième essai est exécuté à une plus grande multiplicité d'infection (MOI:0,5). Il est possible d'observer à la figure 14 que le phénotype n'est pas relié à l'attachement aux acides

sialiques puisque l'infection semble la même, que les cellules soient traitées à la neuraminidase ou pas. Remarquons que seul le virus Wt du laboratoire (T3D\_Lemay) semble démontrer une diminution d'infectivité suite à la perte d'attachement aux acides sialiques. Ce phénotype suggère, à défaut d'un meilleur contrôle, que le traitement à la neuraminidase est efficace.



**Figure 14.** Effets du traitement à la neuraminidase sur l'infection de cellules L929. Immunobuvardage sur  $1,8 \times 10^6$  cellules L929 traitées deux heures à la neuraminidase 10 mU/ml (A.) ou non traitées (B.), infectées avec tous les mutants sous forme de virions à MOI=0,5 pendant 24 heures.

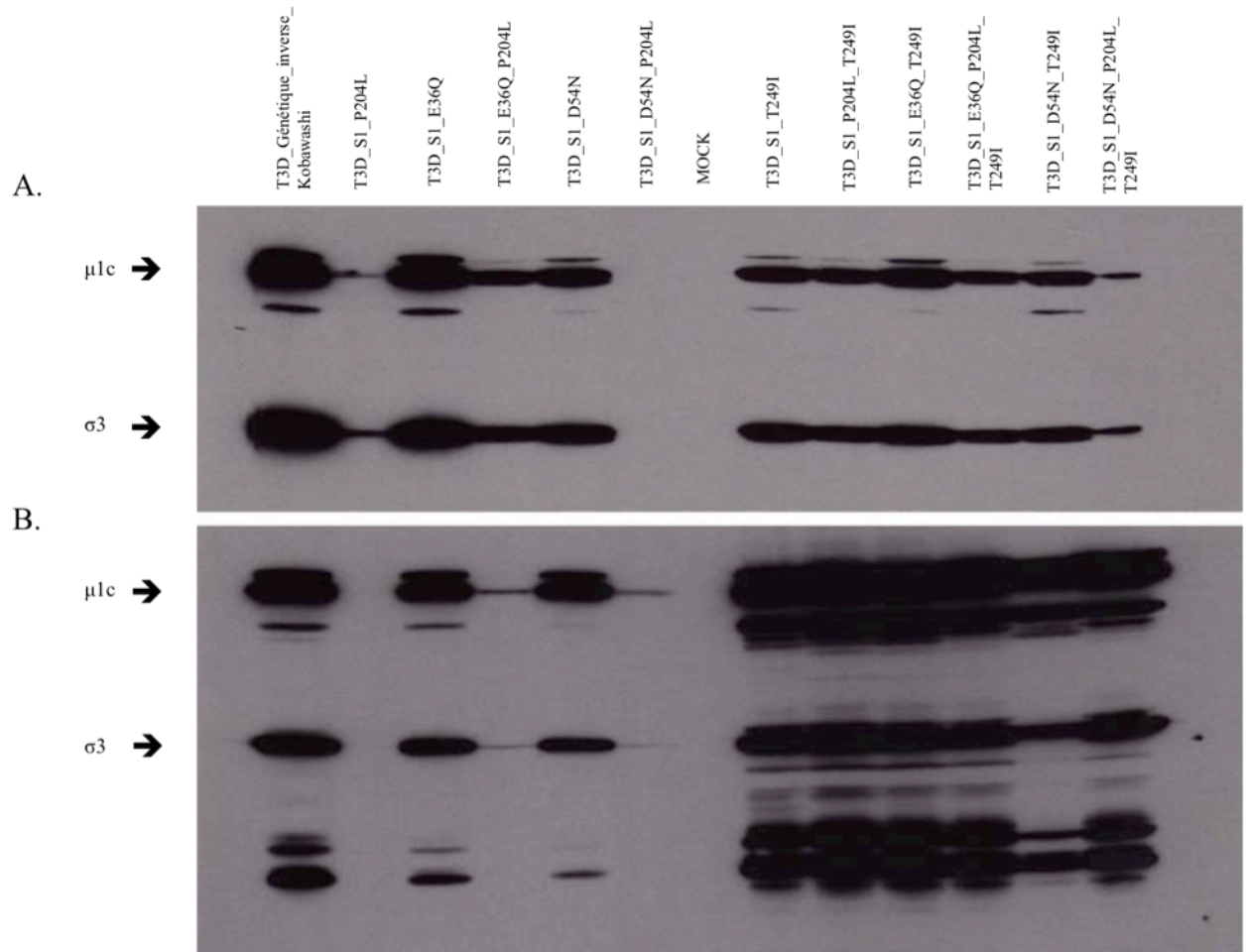
## 4.4 Caractérisation de l'infection sur cellules MDCK

### 4.4.1 Méthode

Trois millions de cellules MDCK sont infectées à  $MOI=0,05$  par les virions ou ISVPs des virus créés. Le culot de cellules infectées est récupéré après 48 heures d'infection afin d'en extraire les protéines virales produites. L'infection des ISVPs se déroule en présence de chymotrypsine (7 ug/ml) afin que l'infection du deuxième cycle de réplication virale s'effectue aussi par des ISVPs. Voir l'article " **Introduction of exogenous polypeptides on mammalian reovirus outer capsid using reverse genetics**" pour plus de détails sur la méthode.

### 4.4.2 Résultats

En vue d'une future caractérisation des virus sur cellules MDCK exprimant la MUC1 à leur surface, une infection sur cellules MDCK est effectuée. L'infection est analysée par immunobuvardage des protéines virales contenues dans les cellules 48 heures après l'infection (figure 15). Une première observation permet de constater que les virions ayant la substitution T249I sont infectieux sur cellules MDCK alors qu'ils ne le semblaient pas sur cellules L929. Aussi, remarquons que le phénotype observé sur cellules L929 par le virion T3D\_S1\_E36Q\_P204L est toujours présent. En effet, cette expérimentation démontre notamment que les ISVPs ayant une thréonine en position 249 démontrent un phénotype différent des virus sous forme de virions avec la même substitution. La combinaison des substitutions E36Q et P204L chez les ISVPs ne semble pas réhabiliter la capacité d'infection en comparaison du mutant P204L seul. Cette réhabilitation est observée chez les virions. Cette différence de phénotype peut nous mettre sur la piste d'une explication.



**Figure 15.** Infection sur cellules MDCK. Immunobuvardage sur  $3,0 \times 10^6$  cellules MDCK infectées par les virions (A.) et ISVPs (B.) à  $MOI=0,05$  pendant 48 heures. L'infection par les ISVPs fut effectuée en présence de chymotrypsine (7 ug/ml). Le virus T3D\_Lemay n'a pas été étudié lors de cette expérience.

Nous pensons que le phénotype observé pourrait être expliqué par l'attachement de  $\sigma 1$  à la protéine cellulaire JAM-A. Les virions ne sont pas soumis à la présence de chymotrypsine et la partie globulaire de la protéine est toujours présente. Ils ont donc la capacité d'attacher à la protéine JAM-A et de poursuivre l'infection via cet attachement. Par contre, la partie globulaire de  $\sigma 1$  des ISVP possédant une thréonine en position 249 est

clivée par la chymotrypsine et les virus ne peuvent plus attacher JAM-A. Ceci pourrait expliquer que le virus T3D\_S1\_E36Q\_P204L ne soit plus infectieux sous forme ISVP alors qu'il l'est sous forme virion. Par contre, suivant cette explication, le mutant T3D\_P204L sous forme de virion devrait toujours être infectieux puisque l'attachement pourrait se faire via JAM-A. Or, ce n'est pas le cas.

L'explication de ce phénotype demeure toujours sous forme d'hypothèse vague impliquant un changement possible de conformation de la protéine  $\sigma 1$  ou du trimère de celle-ci. Changement de conformation qui pourrait engendrer l'exposition d'un site d'attachement pour un récepteur différent de ceux connus et qui serait exprimé différemment chez les cellules L929 et MDCK.

Remarquons aussi que les ISVPs portant la substitution T249I, donc résistants au traitement à la chymotrypsine, ne démontrent aucune variation de leur infectivité, que ce soit sur cellules L929 ou MDCK. Il est suggéré que l'attachement à la protéine JAM-A cache le phénotype qui pourrait être relié aux substitutions des autres sites d'attachement ou d'activité mucinolytique.

## **5. Discussion**

### **5.1 L'ajout d'un tag à la protéine $\sigma 1$**

Chez plusieurs types de cancer, le récepteur spécifique au virus peut être sous-exprimé ou partiellement non disponible pour l'infection virale. Le changement de tropisme est une des approches utilisées en virothérapie afin de sélectionner l'infection des cellules tumorales préférentiellement aux cellules normales. Le premier volet du projet consistait à démontrer la faisabilité de l'ajout d'un tag de 40 acides aminés à la protéine  $\sigma 1$  tout en conservant l'infectivité du virus. Ce segment ajouté pouvant ultérieurement servir d'anti-récepteur alternatif pour un meilleur ciblage des cellules transformées. La méthode de

génétique inverse chez les virus à ARN doubles brins semble outrepasser les limites imposées par la méthode de recapsidation préalablement utilisée.

En effet, par cette méthode, il fut possible de récupérer des virus infectieux comportant un segment additionné d'une longueur de six, neuf puis quarante acides aminés. Les virus récupérés demeurent infectieux, quoique l'expérience de cinétique semble démontrer une légère diminution de l'infectivité. Celle-ci pourrait être attribuée à un attachement diminué des virus portant l'étiquette. En effet, un essai de cytométrie en flux visant à quantifier l'attachement du virus a démontré une diminution de celle-ci de façon concomitante avec la longueur du tag. Il demeure à clarifier si ce phénomène est causé par un encombrement stérique au niveau du récepteur naturel suite à la présence du tag ou par un autre événement. Une étude similaire menée avec l'adénovirus laisse supposer que cette perte au niveau de l'attachement du récepteur naturel du virus pourrait être contrebalancée par un attachement augmenté via le tag dans un type cellulaire approprié (Einfeld et al., 1999).

La présente étude a su démontrer qu'il est possible d'ajouter un segment de 40 acides aminés à l'extrémité C-terminale de  $\sigma 1$ . Par contre, la longueur maximale possible d'un tag ajouté demeure à découvrir. L'ajout du site de restriction *SpeI* ouvre la porte à cette étude. En effet, par ce site, il fut possible de cloner la protéine jaune fluorescente (YFP) à l'extrémité de  $\sigma 1$ . Ce faisant, malgré de multiples tentatives, il fut impossible de récupérer du virus exprimant l'ajout de ce segment de 239 acides aminés. Afin de définir si l'étape limitative se situe au niveau de l'encapsidation du segment ARN ou du repliement de la protéine en sa structure secondaire ou tertiaire, un codon STOP fut ajouté en 5' du segment YFP. Malgré cette précaution, aucun virus ne fut récupéré, insinuant que la difficulté peut se situer à une ou l'autre des étapes du cycle de réplication de réovirus.

### 5.1.1 En perspective

Il fut démontré qu'il est possible d'ajouter un tag à l'extrémité C-terminale de  $\sigma 1$ . Tout comme le groupe de Hoeben l'a fait, il reste à établir que l'entrée du virus peut être médiée par le tag ajouté plutôt que par le récepteur naturel de réovirus. Lors du présent projet, quelques essais d'infection sur cellules exprimant le récepteur pour l'étiquette 6H ont été tentés (résultats non présentés). Le tropisme de réovirus ne semblait pas avoir été modifié à l'avantage du nouveau contre-récepteur. Il ne fut pas étudié si cette difficulté était due à la non expression du récepteur adéquat sur la cellule ou un autre phénomène.

Finalement, il serait intéressant d'expérimenter l'ajout d'un fragment de longueur intermédiaire à 40 et 239 acides aminés à l'extrémité de  $\sigma 1$ . Ceci permettrait de déterminer la longueur limite d'un tag ajouté.

## 5.2 L'activité mucinolytique de réovirus

Deux études précédemment menées au laboratoire ont démontré l'activité mucinolytique de réovirus. Cette activité est reliée au glutamate (E) en position 36 et à l'aspartate (D) en position 54. La position 36 est le site de l'hydrolyse du sucre alors que la position 54 servirait de lieu de liaison au substrat (Bisaillon et al., 1999; Svitek, 2004). L'étude des propriétés catalytique de réovirus envers la mucine est particulièrement intéressante dans le contexte où cette dernière est une cible de choix en oncologie (Limacher & Acres, 2007). Il a été démontré que chez plusieurs types de cancer, particulièrement dans le cas d'adénocarcinome, la protéine MUC1 est non seulement surexprimée, mais aussi glycosylée de façon anormale et non polarisée (Ciborowski & Finn, 2002). La caractérisation de l'infection de réovirus chez les cellules exprimant la mucine pourrait mener à l'optimisation d'un virus doué de capacité oncolytique particulière pour ce type de cancer.

Le présent projet visait une caractérisation de l'activité enzymatique de  $\sigma 1$  sur deux types cellulaires, soit les fibroblastes L929 et les cellules épithéliales de rein MDCK. Le

projet visait à pousser un peu plus loin les limites de la compréhension du phénomène préalablement décrit. Les études précédentes ont été exécutées avec des virus mutants engendrés par la technique de recapsidation, méthode qui ne permet pas l'étude de l'infection sur plusieurs cycles de réplication.

Pour ce projet, la technique de génétique inverse a été utilisée afin de créer des virus portant des substitutions aux lieux d'activité catalytique et d'attachement aux acides sialiques. Certains mutants portaient une combinaison de substitutions pour les deux sites afin de clarifier l'activité reliée à chacun des sites. Tous les virus ont été récupérés, ce qui laisse entendre que les substitutions engendrées permettent un cycle de réplication complet du virus. Aussi, les titres viraux étaient semblables pour tous les virus. Finalement, puisqu'aucune réversion ne fut observée, il est proposé que la pression de sélection pour ces substitutions est faible.

L'infection des mutants sur cellules L929 a démontré que les virions portant une thréonine en position 249 sont infectieux alors que les virions abordant une isoleucine le semblent moins. Lors d'une infection à plus forte MOI avec ces mêmes virions, il est possible de visualiser les protéines. Ce phénotype de diminution d'infection lors de la substitution de la thréonine 249 en isoleucine n'est pas visible sur cellules MDCK. Il est connu que cette substitution engendre une résistance à la chymotrypsine et que ce faisant, la partie globulaire de  $\sigma 1$  n'est pas clivée. Or, les virions n'ont pas été soumis au traitement par les protéases et ce phénotype ne devrait pas être visible, surtout que cette substitution ne semble pas affecter l'infection sur cellules MDCK. Nous savons que la substitution T249I engendre une augmentation du titre des ISVPs par rapport aux virions. Chez les virus portant une thréonine en position 249, la conversion en ISVP amène une baisse du titre alors que chez les virus résistant à la chymotrypsine, le titre viral est augmenté suivant le changement de forme (Chappell et al., 1998). Ce phénotype est expliqué par l'attachement de  $\sigma 1$  au niveau de JAM-A. Chez les ISVP conservant la partie globulaire (T249I), l'attachement est possible alors que le site d'attachement à ce récepteur est clivé chez les virus non résistants (T249). Pour la présente expérience, rappelons que les titrations

effectuées afin de quantifier les particules virales infectieuses avant l'infection l'ont été en présence de chymotrypsine sur cellules Vero. Ce faisant, les titres obtenus pour les virions sont probablement surestimés par rapport à la réalité. Cette façon de faire pourrait expliquer le phénotype obtenu sur cellules L929, mais n'explique pas pourquoi le phénotype n'est pas visible sur cellules MDCK. Ce résultat nous rappelle l'importance de comparer des souches semblables au niveau de leur génome (Lemay, 2011).

Autre résultat intéressant, il a été observé que les substitutions E36Q et D54N ont peu d'effet sur l'infection de cellules n'exprimant pas la mucine. Le niveau d'infectivité de ces virus étant semblable à celui du virus sauvage, la comparaison de l'infectivité sur cellules exprimant la mucine sera possible lors d'une prochaine étude. Aussi, la présente expérience a souligné un phénotype inusité. Il était déjà connu que la substitution P204L, reliée à l'attachement aux acides sialiques, entraîne une diminution de l'infection (Chappell et al., 1997). Or, il fut étonnant de constater que chez le virion, l'ajout de la substitution E36Q, reliée à l'activité catalytique de  $\sigma 1$ , provoque un regain de l'infectivité par rapport au mutant P204L. Ce phénotype est observé sur cellules L929 et sur cellules MDCK et ne serait pas relié à l'attachement aux acides sialiques. Il est proposé que le phénotype pourrait être relié à un changement de conformation du trimère de  $\sigma 1$ . Nous savons que la protéine  $\sigma 1$  est retrouvée sous forme d'homotrimère. Quelques études ont aussi démontré que des mutations en l'extrémité amino-terminale entraîne une instabilité au niveau de cette structure (Leone et al., 1992; Nibert et al., 1990; G. J. Wilson et al., 1996). Il est proposé que l'infectivité intermédiaire du mutant T3D\_S1\_E36Q\_P204L pourrait être reliée à un changement de structure tertiaire des protéines  $\sigma 1$ . Certes, cette explication demeure une proposition et le phénotype observé devra être étudié plus en détails.

### **5.2.1 La caractérisation des mutants, un projet à suivre...**

Le deuxième volet de ce projet, soit la caractérisation des virus mutants en leur capacité d'attachement aux acides sialiques ou activité mucinolytique, n'en est qu'à ses débuts et beaucoup reste à faire.

Il a été démontré que les substitutions E36Q et D54N n'entraînent pas de changement dans la capacité du virus à se répliquer sur une lignée cellulaire n'exprimant pas la mucine. Par contre, malgré plusieurs tentatives infructueuses, aucun essai n'a encore été effectué adéquatement sur un type cellulaire exposant la mucine à sa surface. Quelques expérimentations d'infection avec les virus mutants ont été tentées sur des cellules MDCK ayant été transfectées pour l'expression de MUC1 (Arcasoy et al., 1997). Malheureusement, l'analyse des cellules par cytométrie en flux a démontré que l'expression du sucre n'est pas perpétuée au fil des passages. La suite de ce projet devrait donc passer par la génération de cellules exprimant de façon stable la mucine ou au contraire, de cellules exprimant naturellement la protéine dans lesquelles il est possible d'en diminuer l'expression. Une autre alternative serait de passer directement aux essais sur animaux "*knock-out*" pour l'expression de MUC1 (Nguyen et al., 2011).

Les essais sur cellules produisant de la mucine ou chez l'animal pourraient aussi inclure l'infection par un virus mutant pour les deux sites reliés à l'activité mucinolytique. Le présent projet a démontré une étude préliminaire avec des mutants restreints en leur site de catalyse de l'activité ou d'interaction avec la mucine, mais il n'existe pas de virus ayant ces deux fonctions atténuées. Un virus mutant de type T3D\_S1\_E36Q\_D54N serait donc à prévoir.

Finalement, il serait important de confirmer qu'aucune mutation compensatoire n'est apparue au cours des passages pour les onze mutants générés. Contrairement aux virus qui ont fait l'objet de l'ajout d'un peptide et chez qui l'analyse de séquence a confirmé la conservation de celle-ci pour tout le gène S1, seul un segment du gène a été analysé pour les virus à substitutions ponctuelles. Tel qu'il est démontré en la figure 12, la substitution a été conservée sur cinq passages, et aucune mutation compensatoire n'est apparue pour le segment de 1 à 940 pb. Par contre, le segment de 940 pb à 1416 pb n'a pas été analysé. En se basant sur le fait qu'aucune mutation compensatoire n'est apparue pour le segment analysé, il est à penser qu'il est possible d'extrapoler pour le reste du gène, surtout en sachant que la pression de sélection est faible pour ces substitutions.

### 5.3 La polyvalence de la génétique inverse

La méthode de génétique inverse a été utilisée afin de créer deux types de mutations sur la protéine d'attachement  $\sigma 1$ . Le premier volet du projet a exposé qu'il est possible d'ajouter un segment de quarante acides aminés à l'extrémité C-terminale. Le deuxième volet a démontré l'utilité de cette méthode afin d'engendrer des substitutions ponctuelles. Dans les deux cas, les mutations sont conservées sur plusieurs cycles de réplication. Aussi, cette méthode directe de mutagenèse ne nécessite pas un type cellulaire particulier pour la sélection virale. La technique utilisée par le groupe de Hoeben nécessitait le passage du virus portant l'addition de l'épitope sur un type cellulaire exprimant le contre-récepteur de l'épitope afin de sélectionner les virus portant la mutation. L'adaptation du virus par passage successif a engendré des mutations compensatoires sur le gène S1, et peut-être sur d'autres segments du virus. La méthode de génétique inverse utilisée pour ce projet semble moins susceptible de provoquer ce phénomène.

Depuis le commencement de ce projet, plusieurs améliorations à la méthode de génétique inverse pour réovirus ont été proposées. Pour la présente étude, les cellules BHK-T7 furent utilisées pour la transfection des plasmides de réovirus plutôt que l'utilisation du virus accessoire encodant la polymérase T7. Cette modification au protocole initial élimine l'étape subséquente de sélection du virus nécessaire lors de l'utilisation d'un deuxième virus (Boehme et al., 2011). Ce type cellulaire est maintenant utilisé pour la récupération du virus par d'autres laboratoires. Finalement, il fut proposé d'utiliser quatre plasmides plutôt que dix pour la transfection des gènes de réovirus. Dans cette optique, chaque plasmide porte entre deux et quatre gènes du virus. L'efficacité de transfection s'en trouverait augmentée (Kobayashi et al., 2010).

## Conclusion

Ce projet a démontré l'utilité de la méthode de génétique inverse dans deux contextes différents. Dans un premier temps, il a été possible d'ajouter un tag de diverses longueurs, soit de six, neuf ou quarante acides aminés à l'extrémité de  $\sigma 1$ . Le segment ajouté a été conservé sur plusieurs passages sans provoquer l'apparition de mutations compensatoires pour la plupart des clones viraux. L'addition d'un tag a induit une légère diminution de l'infectivité virale, diminution probablement liée à l'attachement du virus. La création d'un virus comprenant le site de restriction *SpeI* permettra certainement le clonage de segments plus longs lors d'études futures.

En un deuxième temps, il a été possible de créer des virus exposant des substitutions en leurs sites d'activité enzymatique et d'attachement qui perdurent sur plusieurs cycles de réplication. Ces virus ont permis une caractérisation de l'infection sur cellules L929 et MDCK. Il a été démontré que les mutants d'activité catalytiques conservent leur capacité d'infection sur des cellules n'exprimant pas la mucine. Une caractérisation de l'infection sur cellules avec mucine demeure à effectuer.

## Bibliographie

- Aghi, M., & Martuza, R. L. (2005). Oncolytic viral therapies - the clinical experience. *Oncogene*, 24(52), 7802-7816.
- 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. *J Virol*, 68(12), 8428-8432.
- Antar, A. A., Konopka, J. L., Campbell, J. A., Henry, R. A., Perdigoto, A. L., Carter, B. D. et al. (2009). Junctional adhesion molecule-A is required for hematogenous dissemination of reovirus. *Cell Host Microbe*, 5(1), 59-71.
- Arcasoy, S. M., Latoche, J., Gondor, M., Watkins, S. C., Henderson, R. A., Hughey, R. et al. (1997). MUC1 and other sialoglycoconjugates inhibit adenovirus-mediated gene transfer to epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 17(4), 422-435.
- Attoui, H., Biagini, P., Stirling, J., Mertens, P. P. C., Cantaloube, J.-F., Meyer, A. et al. (2001). Sequence Characterization of Ndelle Virus Genome Segments 1, 5, 7, 8, and 10: Evidence for Reassignment to the Genus Orthoreovirus, Family Reoviridae. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 287(2), 583-588.
- Balachandran, S., & Barber, G. N. (2007). PKR in innate immunity, cancer, and viral oncolysis. *Methods Mol Biol*, 383, 277-301.
- Barton, E. S., Connolly, J. L., Forrest, J. C., Chappell, J. D., & Dermody, T. S. (2001). Utilization of sialic acid as a coreceptor enhances reovirus attachment by multistep adhesion strengthening. *J Biol Chem*, 276(3), 2200-2211.
- Barton, E. S., Forrest, J. C., Connolly, J. L., Chappell, J. D., Liu, Y., Schnell, F. J. et al. (2001). Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus. *Cell*, 104(3), 441-451.
- Bergelson, J. M. (2009). Intercellular junctional proteins as receptors and barriers to virus infection and spread. *Cell Host Microbe*, 5(6), 517-521.
- Bisaillon, M., & Lemay, G. (1999). Computational sequence analysis of mammalian reovirus proteins. *Virus Genes*, 18(1), 13-37.

- Bisaillon, M., Senechal, S., Bernier, L., & Lemay, G. (1999). A glycosyl hydrolase activity of mammalian reovirus sigma1 protein can contribute to viral infection through a mucus layer. *J Mol Biol*, 286(3), 759-773.
- Boehme, K. W., Ikizler, M., Kobayashi, T., & Dermody, T. S. (2011). Reverse genetics for mammalian reovirus. *Methods*, 55(2), 109-113.
- Chandran, K., Zhang, X., Olson, N. H., Walker, S. B., Chappell, J. D., Dermody, T. S. et al. (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(11), 5335-5342.
- Chappell, J. D., Barton, E. S., Smith, T. H., Baer, G. S., Duong, D. T., Nibert, M. L. et al. (1998). Cleavage susceptibility of reovirus attachment protein sigma1 during proteolytic disassembly of virions is determined by a sequence polymorphism in the sigma1 neck. *J Virol*, 72(10), 8205-8213.
- 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 sigma1. *J Virol*, 71(3), 1834-1841.
- Chappell, J. D., Prota, A. E., Dermody, T. S., & Stehle, T. (2002). Crystal structure of reovirus attachment protein sigma1 reveals evolutionary relationship to adenovirus fiber. *EMBO J*, 21(1-2), 1-11.
- Ciborowski, P., & Finn, O. J. (2002). Non-glycosylated tandem repeats of MUC1 facilitate attachment of breast tumor cells to normal human lung tissue and immobilized extracellular matrix proteins (ECM) in vitro: potential role in metastasis. *Clin Exp Metastasis*, 19(4), 339-345.
- 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. *Int J Cancer*, 112(2), 190-199.

- Comins, C., Heinemann, L., Harrington, K., Melcher, A., De Bono, J., & Pandha, H. (2008). Reovirus: viral therapy for cancer 'as nature intended'. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 20(7), 548-554.
- Day, J. M. (2009). The diversity of the orthoreoviruses: molecular taxonomy and phylogentic divides. *Infect Genet Evol*, 9(4), 390-400.
- 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(10), 5173-5176.
- Dichter, M. A., & Weiner, H. L. (1984). Infection of neuronal cell cultures with reovirus mimics in vitro patterns of neurotropism. *Ann Neurol*, 16(5), 603-610.
- Dock, G. (1904). The Influence of Complicating Diseases Upon Leukaemia\*. *The American Journal of the Medical Sciences*, 127(4), 563-592.
- Douglas, J. T., Miller, C. R., Kim, M., Dmitriev, I., Mikheeva, G., Krasnykh, V. et al. (1999). A system for the propagation of adenoviral vectors with genetically modified receptor specificities. *Nat Biotechnol*, 17(5), 470-475.
- Duncan, M. R., Stanish, S. M., & Cox, D. C. (1978). Differential sensitivity of normal and transformed human cells to reovirus infection. *J Virol*, 28(2), 444-449.
- Einfeld, D. A., Brough, D. E., Roelvink, P. W., Kovesdi, I., & Wickham, T. J. (1999). Construction of a pseudoreceptor that mediates transduction by adenoviruses expressing a ligand in fiber or penton base. *J Virol*, 73(11), 9130-9136.
- Excoffon, K. J., Guglielmi, K. M., Wetzel, J. D., Gansemer, N. D., Campbell, J. A., Dermody, T. S. et al. (2008). Reovirus preferentially infects the basolateral surface and is released from the apical surface of polarized human respiratory epithelial cells. *J Infect Dis*, 197(8), 1189-1197.
- Gentsch, J. R., & Pacitti, A. F. (1985). Effect of neuraminidase treatment of cells and effect of soluble glycoproteins on type 3 reovirus attachment to murine L cells. *J Virol*, 56(2), 356-364.
- Gomatos, P. J., Tamm, I., Dales, S., & Franklin, R. M. (1962). Reovirus type 3: physical characteristics and interaction with L cells. *Virology*, 17, 441-454.

- Haller, B. L., Barkon, M. L., Li, X. Y., Hu, W. M., Wetzel, J. D., Dermody, T. S. et al. (1995). Brain- and intestine-specific variants of reovirus serotype 3 strain dearing are selected during chronic infection of severe combined immunodeficient mice. *J Virol*, 69(6), 3933-3937.
- Hammill, A. M., Conner, J., & Cripe, T. P. (2010). Oncolytic virotherapy reaches adolescence. *Pediatr Blood Cancer*, 55(7), 1253-1263.
- 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(2-3), 91-98.
- Hashiro, G., Loh, P. C., & Yau, J. T. (1977). The preferential cytotoxicity of reovirus for certain transformed cell lines. *Arch Virol*, 54(4), 307-315.
- Hingorani, P., Zhang, W., Lin, J., Liu, L., Guha, C., & Kolb, E. A. (2011). Systemic administration of reovirus (Reolysin) inhibits growth of human sarcoma xenografts. *Cancer*, 117(8), 1764-1774.
- Jackson, G. G., & Muldoon, R. L. (1973). Viruses causing common respiratory infection in man. IV. Reoviruses and Adenoviruses. *J Infect Dis*, 128(6), 811-866.
- Joklik, W. K., & Roner, M. R. (1995). What reassorts when reovirus genome segments reassort? *J Biol Chem*, 270(9), 4181-4184.
- Kelly, E., & Russell, S. J. (2007). History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering. *Mol Ther*, 15(4), 651-659.
- Kim, M., Garant, K. A., zur Nieden, N. I., Alain, T., Loken, S. D., Urbanski, S. J. et al. (2011). Attenuated reovirus displays oncolysis with reduced host toxicity. *Br J Cancer*, 104(2), 290-299.
- Kim, M., Williamson, C. T., Prudhomme, J., Bebb, D. G., Riabowol, K., Lee, P. W. 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(27), 3990-3996.

- Kirchner, E., Guglielmi, K. M., Strauss, H. M., Dermody, T. S., & Stehle, T. (2008). Structure of reovirus sigma1 in complex with its receptor junctional adhesion molecule-A. *PLoS Pathog*, 4(12), e1000235.
- Kobayashi, T., Antar, A. A., Boehme, K. W., Danthi, P., Eby, E. A., Guglielmi, K. M. et al. (2007). A plasmid-based reverse genetics system for animal double-stranded RNA viruses. *Cell Host Microbe*, 1(2), 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(2), 194-200.
- Kufe, D. W. (2009). Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat Rev Cancer*, 9(12), 874-885.
- Lal, R., Harris, D., Postel-Vinay, S., & de Bono, J. (2009). Reovirus: Rationale and clinical trial update. *Curr Opin Mol Ther*, 11(5), 532-539.
- Lemay, G. (2011). La génétique inverse dans l'étude des réovirus: progrès, obstacles et développements futurs. *Virologie*, 15(1), 53-62.
- Leone, G., Maybaum, L., & Lee, P. W. (1992). The reovirus cell attachment protein possesses two independently active trimerization domains: basis of dominant negative effects. *Cell*, 71(3), 479-488.
- Limacher, J. M., & Acres, B. (2007). [MUC1, a therapeutic target in oncology]. *Bull Cancer*, 94(3), 253-257.
- Linden, S. K., Sutton, P., Karlsson, N. G., Korolik, V., & McGuckin, M. A. (2008). Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal Immunol*, 1(3), 183-197.
- Loken, S. D., Norman, K., Hirasawa, K., Nodwell, M., Lester, W. M., & Demetrick, D. J. (2004). Morbidity in immunosuppressed (SCID/NOD) mice treated with reovirus (dearing 3) as an anti-cancer biotherapeutic. *Cancer Biol Ther*, 3(8), 734-738.
- Maginnis, M. S., Forrest, J. C., Kopecky-Bromberg, S. A., Dickeson, S. K., Santoro, S. A., Zutter, M. M. et al. (2006). Beta1 integrin mediates internalization of mammalian reovirus. *J Virol*, 80(6), 2760-2770.

- Maginnis, M. S., Mainou, B. A., Derdowski, A., Johnson, E. M., Zent, R., & Dermody, T. S. (2008). NPXY motifs in the beta1 integrin cytoplasmic tail are required for functional reovirus entry. *J Virol*, 82(7), 3181-3191.
- 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.
- Mendez, II, She, Y. M., Ens, W., & Coombs, K. M. (2003). Digestion pattern of reovirus outer capsid protein sigma3 determined by mass spectrometry. *Virology*, 311(2), 289-304.
- Mercier, G. T., Campbell, J. A., Chappell, J. D., Stehle, T., Dermody, T. S., & Barry, M. A. (2004). A chimeric adenovirus vector encoding reovirus attachment protein sigma1 targets cells expressing junctional adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(16), 6188-6193.
- Nathanson, N., & Ahmed, R. (1997). *Viral pathogenesis*. Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Nguyen, Y., Procario, M. C., Ashley, S. L., O'Neal, W. K., Pickles, R. J., & Weinberg, J. B. (2011). Limited effects of Muc1 deficiency on mouse adenovirus type 1 respiratory infection. *Virus Res*, 160(1-2), 351-359.
- Nibert, M. L., Dermody, T. S., & Fields, B. N. (1990). Structure of the reovirus cell-attachment protein: a model for the domain organization of sigma 1. *J Virol*, 64(6), 2976-2989.
- Oncolytics Biotech releases REOLYSIN phase I clinical trial results. (2002). *Expert Rev Anticancer Ther*, 2(2), 139.
- 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. *J Biol Chem*, 285(53), 41604-41613.
- Ouattara, L., Paranhos-Baccalà, G., & Komurian-Pradel, F. (2008). Les orthoréovirus: virus orphelins ou pathogènes chez l'homme? *Virologie*, 12(4), 249-260.

- Pal, S. R., & Agarwal, S. C. (1968). Sero-epidemiological study of reovirus infection amongst the normal population of the Chandigarh area--northern India. *J Hyg (Lond)*, 66(4), 519-529.
- Paul, R. W., Choi, A. H., & Lee, P. W. (1989). The alpha-anomeric form of sialic acid is the minimal receptor determinant recognized by reovirus. *Virology*, 172(1), 382-385.
- Pindel, A., & Sadler, A. (2011). The role of protein kinase R in the interferon response. *J Interferon Cytokine Res*, 31(1), 59-70.
- Reiter, D. M., Frierson, J. M., Halvorson, E. E., Kobayashi, T., Dermody, T. S., & Stehle, T. (2011). Crystal structure of reovirus attachment protein sigma1 in complex with sialylated oligosaccharides. *PLoS Pathog*, 7(8), e1002166.
- Roner, M. R., & Joklik, W. K. (2001). Reovirus reverse genetics: Incorporation of the CAT gene into the reovirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(14), 8036-8041.
- Roner, M. R., & Roehr, J. (2006). The 3' sequences required for incorporation of an engineered ssRNA into the Reovirus genome. *Virol J*, 3, 1.
- Roner, M. R., Sutphin, L. A., & Joklik, W. K. (1990). Reovirus RNA is infectious. *Virology*, 179(2), 845-852.
- Rosen, L. (1960). Serologic grouping of reoviruses by Hemagglutination-inhibition. *American Journal of Epidemiology*, 71(2), 242-249.
- Rouault, E., & Lemay, G. (2003). Incorporation of epitope-tagged viral sigma3 proteins to reovirus virions. *Can J Microbiol*, 49(7), 407-417.
- Rubin, D. H., Wetzel, J. D., Williams, W. V., Cohen, J. A., Dworkin, C., & Dermody, T. S. (1992). Binding of type 3 reovirus by a domain of the sigma 1 protein important for hemagglutination leads to infection of murine erythroleukemia cells. *J Clin Invest*, 90(6), 2536-2542.
- Russell, S. J. (2002). RNA viruses as virotherapy agents. *Cancer Gene Ther*, 9(12), 961-966.
- 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.

- Schagen, F. H., Graat, H. C., Carette, J. E., Vellinga, J., van Geer, M. A., Hoebe, R. C. et al. (2008). Replacement of native adenovirus receptor-binding sites with a new attachment moiety diminishes hepatic tropism and enhances bioavailability in mice. *Hum Gene Ther*, 19(8), 783-794.
- Schiff, L. A., Nibert, M. L., & Tyler, K. L. (2007). Orthoreoviruses and their replication. In D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman & S. E. Straus (Eds.), *Fields virology* (5 ed., pp. 1853-1915). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Shatkin, A. J., Sipe, J. D., & Loh, P. (1968). Separation of ten reovirus genome segments by polyacrylamide gel electrophoresis. *J Virol*, 2(10), 986-991.
- Shmulevitz, M., Marcato, P., & Lee, P. W. (2005). Unshackling the links between reovirus oncolysis, Ras signaling, translational control and cancer. *Oncogene*, 24(52), 7720-7728.
- Silverstein, S. C., Astell, C., Levin, D. H., Schonberg, M., & Acs, G. (1972). The mechanisms of reovirus uncoating and gene activation in vivo. *Virology*, 47(3), 797-806.
- Stoeckel, J., & Hay, J. G. (2006). Drug evaluation: Reolysin--wild-type reovirus as a cancer therapeutic. *Curr Opin Mol Ther*, 8(3), 249-260.
- 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.
- Svitek, N. (2004). *Étude du rôle de l'activité glycosidase de la protéine virale  $\sigma 1$  dans l'infectivité du réovirus*. Montréal: Université de Montréal.
- Tai, J. H., Williams, J. V., Edwards, K. M., Wright, P. F., Crowe, J. E., Jr., & Dermody, T. S. (2005). Prevalence of reovirus-specific antibodies in young children in Nashville, Tennessee. *J Infect Dis*, 191(8), 1221-1224.
- Tyler, K. L., McPhee, D. A., & Fields, B. N. (1986). Distinct pathways of viral spread in the host determined by reovirus S1 gene segment. *Science*, 233(4765), 770-774.

- Ulloa, F., & Real, F. X. (2001). Differential distribution of sialic acid in alpha2,3 and alpha2,6 linkages in the apical membrane of cultured epithelial cells and tissues. *J Histochem Cytochem*, 49(4), 501-510.
- van den Wollenberg, D. J., van den Hengel, S. K., Dautzenberg, I. J., Cramer, S. J., Kranenburg, O., & Hoeben, R. C. (2008). A strategy for genetic modification of the spike-encoding segment of human reovirus T3D for reovirus targeting. *Gene Ther*, 15(24), 1567-1578.
- Weaver, E. A., Mercier, G. T., Gottschalk, S., & Barry, M. A. (2012). T-cell-biased immune responses generated by a mucosally targeted adenovirus-signal1 vaccine. *Mucosal Immunol*.
- Weiner, H. L., Powers, M. L., & Fields, B. N. (1980). Absolute linkage of virulence and central nervous system cell tropism of reoviruses to viral hemagglutinin. *J Infect Dis*, 141(5), 609-616.
- Wilson, G. A., Morrison, L. A., & Fields, B. N. (1994). Association of the reovirus S1 gene with serotype 3-induced biliary atresia in mice. *J Virol*, 68(10), 6458-6465.
- Wilson, G. J., Wetzel, J. D., Puryear, W., Bassel-Duby, R., & Dermody, T. S. (1996). Persistent reovirus infections of L cells select mutations in viral attachment protein signal1 that alter oligomer stability. *J Virol*, 70(10), 6598-6606.
- Woo, Y., Adusumilli, P. S., & Fong, Y. (2006). Advances in oncolytic viral therapy. *Curr Opin Investig Drugs*, 7(6), 549-559.
- Zhang, B., Lim, T. S., Vedula, S. R., Li, A., Lim, C. T., & Tan, V. B. (2010). Investigation of the binding preference of reovirus signal1 for junctional adhesion molecule A by classical and steered molecular dynamics. *Biochemistry*, 49(8), 1776-1786.

