

Infection persistante en culture cellulaire par le réovirus de mammifère : un modèle de coévolution virus-cellule

Viral persistence of mammalian reovirus in cell culture: a model of virus-cell coevolution

Guy Lemay

Université de Montréal,
Département de microbiologie,
infectiologie et immunologie,
Université de Montréal
CP 6128, Succ. Centre-ville
Montréal, QC, Canada H3C 3J7

Résumé. Bien qu'étant peu pathogène chez l'humain, le réovirus de mammifère a été, et demeure, un modèle privilégié d'étude de la réplication et de la pathogenèse virale. Généralement considéré comme étant cytolitique, ce virus peut parfois établir des infections persistantes à long terme en culture cellulaire. Dans ce contexte, il constitue en fait un des modèles parmi les plus utilisés pour démontrer la coévolution entre virus et cellules. Bien qu'initialement surtout limitées au modèle des cellules fibroblastiques de souris L929, les dernières années ont vu apparaître d'autres études au sein de différents types cellulaires. L'utilisation de la persistance virale pourrait devenir un outil de prédilection pour isoler de nouveaux virus mieux adaptés à des utilisations virothérapeutiques, par exemple en tant qu'agents oncolytiques contre des cancers humains ou animaux. Une meilleure compréhension du phénomène de persistance, spécialement des gènes viraux impliqués, s'avère donc essentielle. Le développement de nouveaux outils, tel que l'utilisation de la génétique inverse, apparaît très prometteur pour l'atteinte de ces objectifs. Cette dernière approche permet en effet d'établir la signification biologique de mutations retrouvées chez les virus sélectionnés lors de la persistance virale.

Mots clés : réovirus, persistance virale, décapsidation, interféron, évolution virale

Abstract. Although mammalian reovirus exhibits only limited pathogenicity in humans, it has been, and still remains, instrumental in studies of viral replication and pathogenesis. Generally considered as cytolytic, this virus can sometimes establish long-term persistent infections in tissue culture. In fact, in this context, it constitutes one widely used model to demonstrate coevolution between virus and host cells. Initially limited to the murine L929 fibroblasts model, further studies in different cell types appeared in the last few years. Establishment of viral persistence could also become a preferred approach to isolate new viruses that are better adapted to their applications in virotherapy, for example as oncolytic agents against human or animal cancers. A better understanding of the persistence phenomenon, especially of viral genes involved, is thus essential. The development of new tools, such as reverse genetics, appears very promising to achieve these objectives. Actually, this last approach allows us to establish the biological significance of mutations found on viruses selected during viral persistence.

Key words: reovirus, virus persistence, uncoating, interferon, virus evolution

Correspondance : G. Lemay
<guy.lemay@umontreal.ca>

Principes généraux

Certains virus cytotolytiques, comme le réovirus de mammifère (« réovirus » pour la suite du texte), peuvent parfois établir une infection non lytique persistante en culture cellulaire. Bien que dépassant le cadre de la présente revue, l'importance de « revisiter » le concept de virus dit « cytotolytique » a été récemment soulignée [1]. En effet, le réovirus de mammifère, bien que normalement considéré cytotolytique, peut être libéré de certains types de cellules infectées, en absence de lyse cellulaire [2, 3].

Le phénomène de persistance virale en culture cellulaire, donc loin d'être seulement une curiosité de laboratoire, peut constituer un système expérimental puissant pour l'étude de certaines étapes importantes du cycle viral de multiplication. L'établissement de la persistance virale peut s'accompagner de changements importants dans les propriétés du virus lui-même, mais également de sa cellule hôte, et constituer ainsi un modèle biologique pertinent de la coévolution virus-hôte.

Parmi les virus de mammifère, le réovirus a été largement utilisé comme modèle de réplication virale et de pathogénèse. Plus récemment, on note un regain d'intérêt pour l'étude de ce virus puisqu'il est actuellement l'objet d'essais cliniques dans des approches virothérapeutiques contre divers cancers [4, 5]. Le réovirus, sous son nom commercial de Reolysin[®], a d'ailleurs reçu le statut de « médicament orphelin », par la *Food and Drug Administration* (FDA) aux États-Unis et par l'Agence européenne des médicaments (EMA).

Il n'est donc pas surprenant que ce virus, en dépit du fait qu'il soit généralement cytotolytique, ait fait l'objet de diverses études concernant sa capacité à établir et à maintenir une persistance virale, essentiellement en culture cellulaire. De telles études ont eu dans le passé un impact important sur notre compréhension de la réplication des réovirus et de leurs interactions avec les cellules hôtes et ont encore le potentiel de contribuer davantage à cette compréhension. De plus, de telles approches pourraient aider à développer des applications pratiques pour le réovirus, en permettant la sélection de nouveaux variants viraux mieux adaptés à infecter et détruire les cellules cancéreuses, entre autres choses [6, 7].

De façon surprenante, malgré le fait que la persistance virale a maintenant été obtenue dans de nombreuses lignées cellulaires différentes, peu de virus adaptés ont vu leurs séquences génomiques complètement déterminées. En effet, seule la séquence du virus adapté aux cellules Vero, virus obtenu dans notre laboratoire, a été complètement déterminée [8]. Les progrès dans les approches de séquençage permettront certainement de corriger cette situation dans un proche avenir. De plus, l'avènement de la

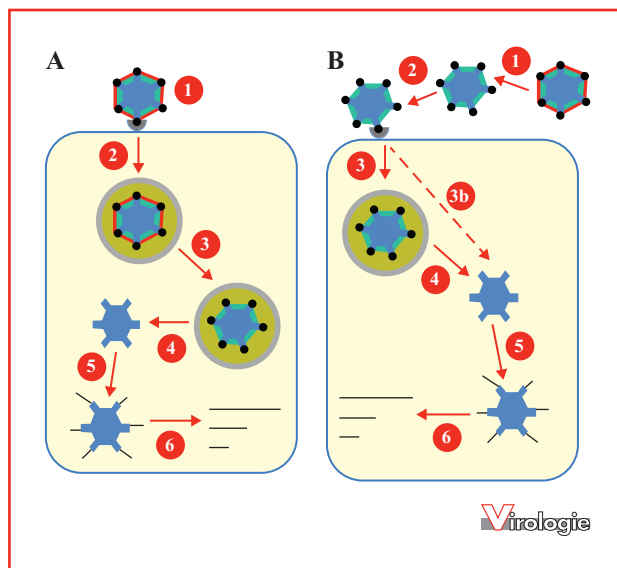


Figure 1. Fixation et entrée de réovirus. A) Le schéma présente les principales étapes de l'entrée du virus à partir du virion. Dans un premier temps, (1) celui-ci se fixe à la surface cellulaire par la protéine trimérique de spicule $\sigma 1$ (sphère noire). Après l'endocytose (2), l'activité des protéases lysosomales permet le retrait de la protéine $\sigma 3$ (en rouge) et le clivage de la protéine $\mu 1$ (en vert) (3), permettant à la particule de traverser la membrane de l'endosome. La sortie de l'endosome (4) s'accompagne de l'élimination de la protéine $\sigma 1$ et de la portion résiduelle de la protéine $\mu 1$. Ces dernières étapes impliquent la participation de protéines cellulaires jouant le rôle de chaperon moléculaire. La particule virale se retrouve finalement dans le cytoplasme sous forme de nucléoïde (ou *core*), particule complètement dépourvue de protéines de la capsid externe et transcriptionnellement active (5). Le nucléoïde ainsi relargué dans le cytoplasme permet la synthèse des trois classes d'ARN messager viral (6). **B)** Le schéma représente l'entrée virale lorsque le virion est tout d'abord partiellement décapsidé par l'action de protéases extracellulaires. (1) La particule sous-virale infectieuse (ISVP) se fixe à la membrane (2) pour soit être internalisée par endocytose (3) ou, alternativement, pénétrer directement au travers de la membrane plasmique (3b), contournant dans les deux cas le besoin en protéases endosomale/lysosomale. Dans tous les cas, le nucléoïde est par la suite généré (4) pour permettre la transcription comme dans le cas du virion (5, 6).

généétique inverse à partir de plasmides permet maintenant de confirmer l'importance des différentes mutations observées chez les virus adaptés. Ces mutations peuvent ainsi être introduites séparément dans un squelette de virus de type sauvage, comme effectué dans certains de nos travaux récents [8, 9].

Comme nous le verrons plus loin, les étapes initiales du cycle de réplication viral menant à l'entrée du virus sont au cœur du phénomène de persistance virale (*figure 1*) [10-12]. À la suite de la fixation de la protéine $\sigma 1$ du virus à la surface cellulaire, la particule virale est internalisée. La protéine $\sigma 1$ possède une longue portion hélicoïdale dans la région

aminoterminal, incluant la séquence à l'extrémité permettant l'ancrage de la protéine au virion. La région centrale de la protéine permet la fixation aux acides sialiques chez les souches possédant cette propriété, dont la souche Dearing du sérotype 3, généralement utilisée dans les études de la persistance virale. La protéine se termine par une région globulaire à l'extrémité carboxyterminale impliquée dans la fixation au récepteur protéique le plus largement utilisé par le virus pour la fixation aux cellules épithéliales, la protéine JAM (*junctional adhesion molecule*) [10, 13]. Le clivage des protéines de la capsid externe, débutant par la protéine de capsid externe $\sigma 3$, a lieu dans un premier temps suite à l'internalisation de la particule. Par la suite, le clivage de la protéine $\mu 1$ de la capsid externe permet la génération de particules infectieuses dites « sous-virales » (*infectious subviral particles* [ISVP]) qui peuvent alors traverser la membrane des endosomes vers le cytoplasme, permettant par la suite l'activation de la transcription à partir de la capsid interne du virus (nucléotide ou *core* en anglais). La décapsidation partielle du virus par des enzymes lysosomales, générant les ISVP, est un facteur limitant dans de nombreux types de cellules [14-18]. Les ISVP peuvent aussi être générées par clivage protéolytique à l'extérieur des cellules, permettant de contourner les étapes de décapsidation intracellulaire. À noter que la structure des protéines $\sigma 1$ et du complexe hétérohexamérique $\sigma 3$ - $\mu 1$ [19-21] a été déterminée et sera discutée plus loin (*figure 3* et *figure 4*).

Environ une douzaine de lignées cellulaires différentes ont été rapportées comme pouvant être infectées de manière persistante par le réovirus dans certaines conditions. Cependant, cela dépend de la définition donnée à l'infection « persistante ». À titre d'exemple, l'infection de la lignée cellulaire Tb1-Lu de chauve-souris aboutit à une infection productive, mais avec une mort cellulaire minimale [22]. La production de virus semble diminuer lentement avec le temps sans changements réels dans les cellules ou les virus. Il s'agirait donc plutôt d'une infection « non lytique » ou « chronique », plutôt que d'une réelle infection persistante en tant que telle, comme discutée plus loin. Dans certains types de cellules chez lesquelles l'établissement d'une infection persistante a été décrit sans aucun effet cytopathique apparent, comme dans les cellules MDCK [23], on a probablement affaire à un phénomène similaire où la persistance virale avec toutes ses conséquences n'est pas nécessairement établie. En fait, nos propres résultats étaient très différents dans cette lignée cellulaire (données non publiées). Cela soulève la question des variations dans les lignées cellulaires et virus utilisés d'un laboratoire à l'autre et complique davantage les comparaisons. De plus, dans plusieurs cas, les virus et les cellules ont été mal caractérisés après établissement de la persistance. Un autre exemple concerne l'observation selon laquelle une infection persistante par le réovirus affecte les propriétés de croissance des

fibroblastes murins BALB 3T3 [24]. Des travaux ultérieurs ont plutôt démontré que les réovirus infectent préférentiellement les cellules NIH-3T3 transformées alors que les cellules parentales sont assez résistantes à l'infection [25, 26]. Cela suggère que le stock cellulaire utilisé lors de l'établissement de la persistance virale aurait pu être en partie formé de cellules spontanément transformées au sein de la culture, comme cela arrive lorsque celles-ci sont maintenues à confluence pendant un certain temps. Sinon, une contamination par un autre type de cellule est toujours possible.

Dans le cadre de cette revue, nous définirons l'infection persistante à réovirus comme une infection établie après une période de lyse cellulaire chez des cellules où l'infection est cytolitique dans les conditions usuelles d'infection. La majorité des cellules sont alors infectées, mais une réinfection constante est nécessaire pour le maintien de l'infection. Nous verrons plus loin que cet état s'accompagne de changements à la fois chez le virus et les cellules concernées.

Nous allons maintenant examiner plus en détail quelques modèles cellulaires au sein desquels l'infection persistante par le réovirus a été étudiée de manière plus approfondie.

Le modèle classique en cellules L929

Initialement, l'essentiel des études sur la persistance virale par le réovirus a été effectué en utilisant la lignée L929 de cellules fibroblastiques de souris utilisées couramment pour la multiplication du réovirus. La persistance virale dans ce modèle cellulaire a été décrite en 1998 [27] ; nous résumerons brièvement ici les aspects principaux et discuterons plus en détail des progrès réalisés depuis cette revue détaillée.

Lors de l'infection par le réovirus, les cellules L929 sont rapidement tuées et détruites, parfois en moins de 24 heures à 37° C, selon la multiplicité d'infection utilisée. Cependant, un tout petit nombre de cellules peut malgré tout survivre. Ces cellules vont lentement croître avec des phases fréquentes de « crises » lors desquelles la mort cellulaire sera importante. Néanmoins, après cette période relativement longue d'établissement de la persistance, une population cellulaire peut être sélectionnée. Ces cellules produisent et libèrent du virus infectieux de manière continue sans être lysées ; le virus produit reçoit alors l'appellation de virus PI (*de persistent infection*). Les cellules infectées de manière persistante peuvent éliminer le virus lors d'une exposition à long terme à un antisérum neutralisant [28]. De manière intéressante, ces cellules dites « guéries » sont passablement résistantes au virus sauvage, mais elles sont facilement détruites lors d'une infection par le virus PI correspondant. La *figure 2A* présente un

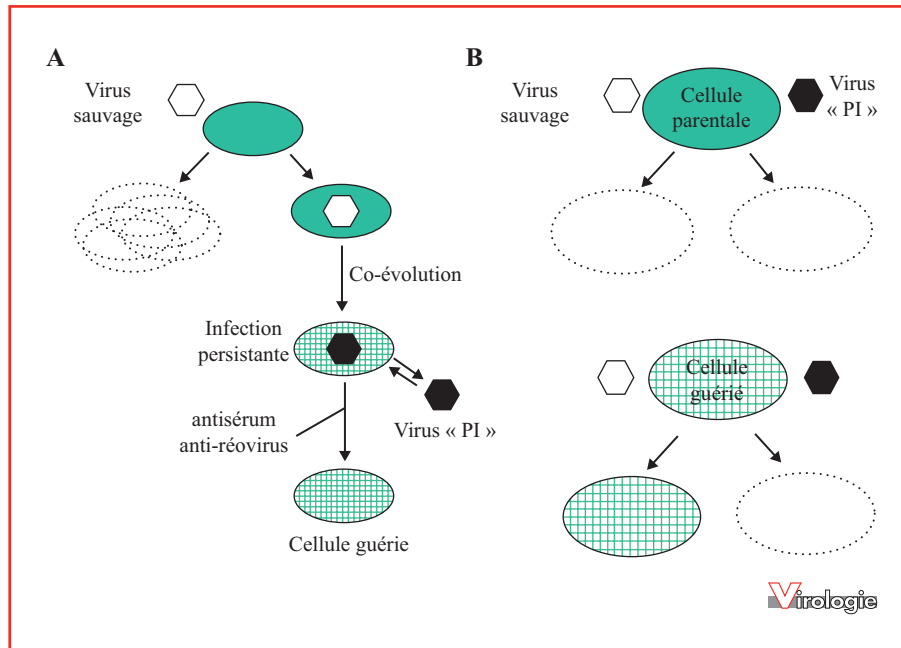


Figure 2. Établissement de la persistance virale et coévolution virus-cellule. A) Lors de l'infection de cellules par un réovirus de type sauvage, la majorité des cellules seront tuées et détruites par cytolysse (en pointillés). Toutefois, quelques cellules peuvent être épargnées et devenir infectées de manière persistante (en vert). Avec le temps, la cellule pourra évoluer (quadrillée) tout comme le virus pour devenir un virus dit PI (*persistent infection*) (en noir). Il s'établit un état d'équilibre avec libération de particules virales et réinfection constante des cellules. De telles cellules peuvent être « guéries » de leur infection par ajout d'un antisérum neutralisant qui prévient la réinfection des cellules. **B)** Les cellules originales parentales peuvent être infectées et détruites avec le virus sauvage ou le virus récupéré de cellules infectées de manière persistante (virus PI). Par contre, les cellules dites « guéries », ayant été en contact avec le virus pendant une longue période de temps lors de la persistance virale, sont résistantes au virus sauvage de départ, mais sensibles au virus PI.

résumé schématique de l'établissement de la persistance virale chez les cellules L929 alors que la *figure 2B* présente le résultat de la coévolution virus-cellules. Différents travaux ont permis de démontrer que les cellules guéries ont été sélectionnées pour exprimer des taux réduits de cathepsines lysosomales [29, 30] ; ces cellules sont donc inefficaces à éliminer les protéines de la capsid externe lors de la décapsidation. En parallèle, les virus PI ont, eux, évolué afin d'être en mesure d'infecter les cellules guéries. Des études utilisant l'approche de génétique classique par échange de gènes (réassortiment) ont impliqué la protéine de la capsid externe, $\sigma 3$, ainsi que la protéine de fixation à la cellule, $\sigma 1$, respectivement dans l'établissement et le maintien de la persistance virale [31, 32]. À ce jour, aucun génome complet d'un virus PI complet provenant de cellules L929 n'a été obtenu, mais la séquence des gènes codant ces deux protéines qui apparaissent cruciales l'a été. Cependant, ce séquençage n'a pas été effectué directement sur des produits de PCR, comme habituellement utilisé à l'heure actuelle, mais plutôt par clonage d'ADN complémentaire ; cela soulève la possibilité de séquençage d'une population minoritaire non nécessairement représentative du virus authentique se répliquant au sein des cellules. Il

serait certainement intéressant de confirmer ces séquences sur différentes populations de virus PI. Cependant, l'étude des substitutions d'acides aminés de la protéine $\sigma 3$, principalement la substitution Y354H, a permis d'établir de manière claire que ces substitutions rendent le virion plus sensible aux cathepsines [33]. Cette modification permet ainsi sa décapsidation dans les cellules guéries alors que le virus sauvage est bloqué dans ces conditions réduites en protéases. En conséquence, les virus PI sont résistants aux inhibiteurs de l'acidification endosomale (acidification nécessaire pour permettre la formation des cathepsines matures) et, plus directement, aux inhibiteurs de protéases endosomales, tels que le E64 [33-37]. Les virions de virus PI se comportent donc en quelque sorte comme des ISVP. La structure par cristallographie aux rayons X permet de localiser les substitutions d'acides aminés sur la protéine $\sigma 3$ pour les différents virus PI connus, tel que présenté sur la *figure 3*. Comme discuté plus loin, des substitutions au sein de la protéine $\sigma 3$ sont aussi présentes chez des virus PI obtenus d'autres lignées cellulaires. La structure moléculaire est disponible pour l'homodimère de $\sigma 3$, ainsi que pour l'hétérohexamère de $\sigma 3$ - $\mu 1$, la composante majeure de la capsid externe, et complétée par la suite par cryomi-

croscopie du virion [19-21]. Les différentes substitutions sont toutes localisées sur le petit lobe externe de la protéine et sont donc susceptibles d'affecter la protéolyse de la protéine $\sigma 3$ [10, 12, 38, 39]. Ces substitutions sont situées à la surface de la protéine et en dehors de la zone de contact entre les deux exemplaires de la molécule sous sa forme dimérique. Les substitutions sont aussi à l'extérieur de la zone de contact entre les deux protéines $\sigma 3$ et $\mu 1$ dans le complexe hétérohexamérique à la surface du virion.

On peut se demander pourquoi les virus de type sauvage n'ont pas acquis cette capacité à se décapsider plus facilement, ce qui peut sembler avantageux. En effet, un tel virus est plus pathogène et semble se transmettre plus efficacement dans un modèle animal [40]. Il est toutefois possible qu'un pouvoir pathogène accru soit en fait désavantageux à long terme pour le virus ; par contre, il est aussi possible que le test de transmission utilisé ne soit pas un reflet exact de l'impact négatif d'une diminution de la stabilité du virion dans l'environnement. Quoiqu'il en soit, des études plus approfondies des souches de réovirus en environnement naturel apparaissent nécessaires pour mieux comprendre si de telles mutations apparaissent ou non, et se maintiennent ou non dans des conditions naturelles.

Le rôle exact des substitutions de $\sigma 1$ dans ces virus demeure peu clair ; il a été suggéré qu'elles peuvent affecter la stabilité du complexe formé par trois exemplaires de la protéine [41], mais l'impact exact n'a pas été étudié de façon approfondie. La détermination de la structure [42, 43] permet maintenant de localiser les substitutions de manière plus précise, ce qui confirme leur localisation au niveau de la région hélicoïdale (*figure 4*). Il n'est toutefois pas possible d'affirmer sans ambiguïté qu'elles puissent exercer un effet sur la stabilité de la protéine [42]. À noter également que certaines de ces mutations chevauchent le cadre de lecture pour la petite protéine $\sigma 1s$, codée par le même gène *S1* ; il est donc difficile d'attribuer sans ambiguïté le phénotype aux changements à la protéine $\sigma 1$. L'avènement de la génétique inverse pourrait probablement mener à une meilleure compréhension de l'importance de ces substitutions diverses. Fait intéressant, dans deux autres types de cellules différentes la persistance est aussi accompagnée de changements dans la protéine $\sigma 1$ (ou $\sigma 1s$). Ce point sera discuté dans une section subséquente.

La situation en cellules Vero

Au cours des dernières années, notre laboratoire a caractérisé en détail un virus obtenu à la suite de l'infection persistante par le réovirus dans les cellules Vero. Ces cellules ont été choisies, car elles semblent posséder au départ une capacité limitée à décapsider le virus [14], suggérant que l'adaptation dans ces cellules pourrait relever d'un

mécanisme jouant à un autre niveau que la décapsidation en tant que telle. Elles présentent aussi des défauts bien connus dans la production antivirale d'interféron et dans la protéine kinase induite par l'interféron, PKR (*protein kinase double-stranded-RNA-dependent*) [44-47]. La séquence génomique du virus PI obtenu des cellules Vero nommé VeroAV (pour *Vero-cell-adapted virus*) a été entièrement obtenue et a révélé des substitutions d'acides aminés dans quatre des 11 produits de traduction des dix gènes viraux [8]. L'utilisation de la génétique inverse a ensuite permis de démontrer qu'une seule substitution d'acides aminés dans la protéine $\sigma 1$, N198K, est responsable de l'adaptation du virus aux cellules Vero en augmentant la liaison aux acides sialiques (*figure 4*) [9]. Fait intéressant, dans ce cas, il n'y avait pas de changement dans la protéine $\sigma 3$ ni de changement au niveau de la décapsidation en tant que telle. Toutefois, la protéine $\mu 1$ a simultanément évolué ce qui la rend apparemment plus compatible avec la protéine $\sigma 1$ modifiée. De manière intéressante, la substitution N198K dans $\sigma 1$ est apparue en premier lors de l'établissement de la persistance ; cela suggère qu'il s'agit bien du déterminant critique de l'adaptation aux cellules Vero, l'autre substitution (Q78P) étant apparue par la suite. La mutation dans le gène codant la protéine $\sigma 1$ entraîne également une substitution unique d'acides aminés dans une seconde protéine ($\sigma 1s$), une petite protéine retrouvée dans un second cadre de lecture sur le même gène [8]. Comme discuté plus loin, cette substitution serait un déterminant important de la sensibilité à l'interféron.

En même temps que les substitutions au niveau de la protéine $\sigma 1$, des changements au niveau de la protéine $\mu 1$ sont également apparus. Ces substitutions (E89G et A114V) sont probablement responsables d'un désassemblage accéléré du virion [9, 48]. Cependant, encore là, ces changements ne sont peut-être pas désirables en conditions naturelles puisqu'ils entraîneraient une sensibilité accrue aux protéases dans le tractus gastro-intestinal [9, 48]. À ce jour, il s'agit du seul exemple d'une modification de la protéine $\mu 1$ dans le contexte de la persistance virale. Des études actuellement en cours au laboratoire, visent à mieux comprendre l'importance, ou non, de chacune de ces substitutions [49]. Il est intéressant de noter qu'une d'entre elles (position E89) a été examinée indépendamment par un autre groupe lors d'études visant à caractériser l'importance de la boucle formée par la région 72-96 de la protéine [50]. Une substitution à cette position entraînait un phénotype de petites plages en présence de chymotrypsine, un phénotype également observé dans nos propres études [9, 48], malgré le fond génétique différent entre les virus de ces différentes études. Aussi, alors que la coévolution (ou co-adaptation) de la protéine $\mu 1$ et de la protéine $\sigma 1$ est essentielle chez VeroAV [9], des travaux subséquents ont indiqué un effet de $\mu 1$ sur le phénotype d'infectivité attribuable à $\sigma 1$. Cela

souligne l'importance d'une compatibilité entre ces deux protéines [51-53]. Ces observations sont aussi en accord avec des études antérieures indiquant un rôle de $\mu 1$ dans des phénotypes attribuables au gène S1 [54-58], bien que dans certains cas ceux-ci dépendent peut-être du second cadre de lecture présent et codant pour $\sigma 1s$. En dépit de l'absence d'interaction directe entre les deux protéines, $\sigma 1$ et $\mu 1$, un effet indirect sur la structure de la particule virale pourrait affecter l'ancrage ou l'exposition de $\sigma 1$ à la surface de la particule virale [48].

Autres modèles cellulaires

En plus des cellules L929, une autre lignée cellulaire de fibroblastes de souris a été étudiée pour la capacité du réovirus à y établir une infection persistante. Ces cellules, les fibroblastes embryonnaires de souris sauvages de la lignée SC1, ont été initialement choisies, car elles présentent une inhibition de la synthèse des protéines de la cellule hôte réduite et une mort retardée lors de l'infection [59]. Lorsqu'elles sont infectées par un stock de réovirus de type sauvage, un pourcentage plus élevé des cellules peut survivre, par rapport à la situation observée avec les cellules L929. En conséquence, la persistance est plus facilement établie dans ces cellules, mais le phénomène de coévolution de la cellule hôte peut tout de même être observé. Bien que les modifications cellulaires exactes n'aient pas été examinées, des cellules guéries ont pu être obtenues et elles présentent également une résistance au virus de type sauvage et une sensibilité au virus PI récupéré à partir de ces cellules (données non publiées). Le séquençage partiel du virus PI a révélé une substitution d'acide aminé à une position différente sur la protéine $\sigma 3$ à proximité de celles observées précédemment sur les virus PI obtenus de cellules L929 [48] (*figure 3*) ; il s'est avéré que le virus était aussi plus résistant à la présence d'inhibiteurs de décapsidation (données non publiées).

Divers types de cellules humaines ont également été examinés, dont les lignées lymphocytaires Raji et CA46 ainsi que les cellules de fibrosarcome HT1080 [60-62]. Un changement dans la séquence de la protéine $\sigma 3$, suggérant un clivage facilité de la protéine, est également sélectionné chez ces cellules (*figure 3*), mais pas toujours exclusivement. Une version tronquée de la protéine $\sigma 1$ a également été trouvée dans au moins un cas (*figure 4*). Cela souligne encore l'importance des deux protéines $\sigma 3$ et $\sigma 1$, deux protéines critiques lors de l'entrée du virus dans la cellule hôte. Cependant, dans tous ces cas, la séquence complète du virus n'a pas été déterminée, ce qui complique l'interprétation.

Un dernier cas de persistance virale est celui des cellules de la lignée CHO (cellules ovariennes d'hamster chinois) avec sélection de virus PI adapté et coévolution virus-cellules

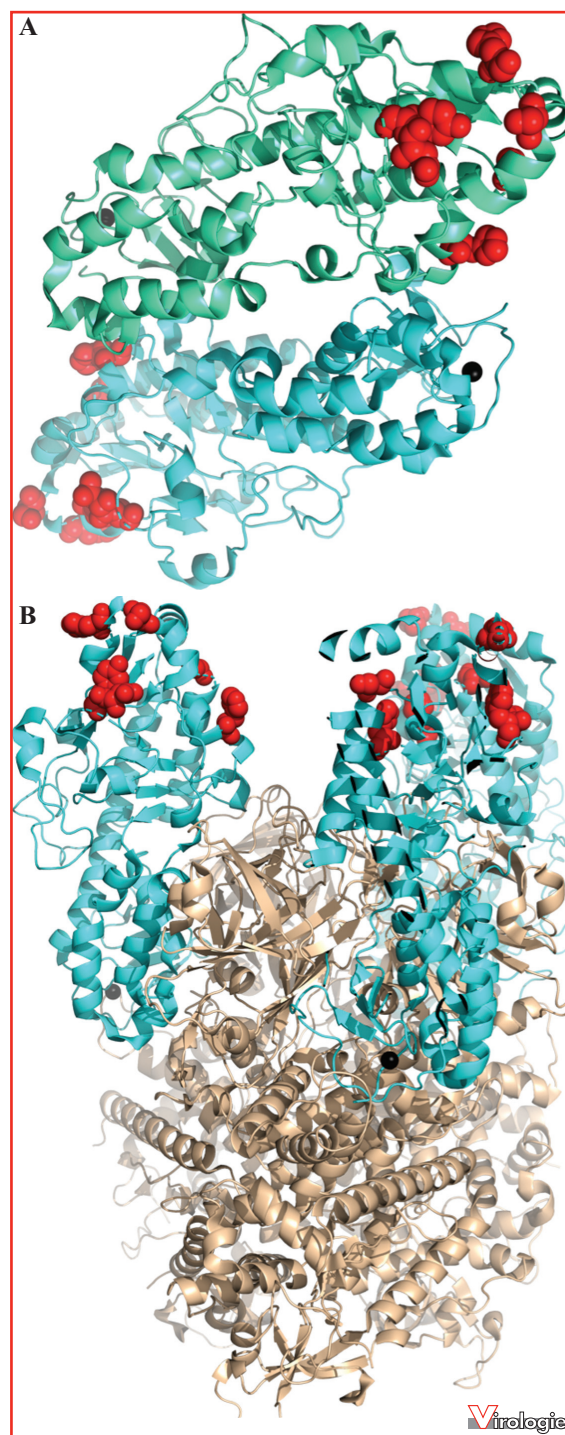


Figure 3. Position des substitutions d'acides aminés de la protéine $\sigma 3$. A) La structure cristallographique de la forme dimérique de la protéine $\sigma 3$ (en vert et cyan) (PDB : 1FN9) est présentée [19]. B) L'hétérohexamère composé de trois molécules de la protéine $\sigma 3$ (cyan) à la surface du virion, coiffant trois molécules de la protéine $\mu 1$ (en brun pâle) (PDB : 1JMU) est présenté [20]. Les acides aminés substitués chez divers virus PI sont indiqués sous forme de sphères rouges sur la structure de la protéine $\sigma 3$.

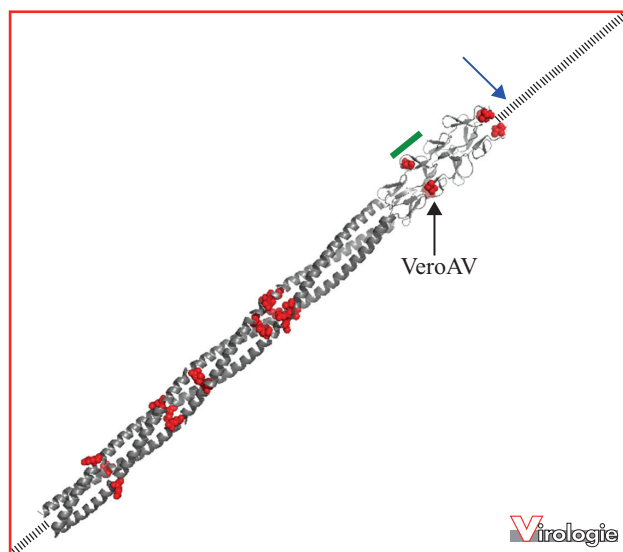


Figure 4. Position des substitutions d'acides aminés de la protéine $\sigma 1$. La structure cristallographique de la forme trimérique de la protéine $\sigma 1$ (PDB : 6GAP) [42] est présentée. Les acides aminés substitués chez divers virus PI sont indiqués sous forme de sphères rouges, la substitution démontrée comme importante chez le virus PI isolé de cellules Vero (VeroAV) est indiquée. Les 26 premiers acides aminés et les 215 derniers acides aminés, comprenant la structure globulaire de la protéine, sont absents de cette structure (lignes pointillées). La flèche bleue indique la position de la fin de la forme tronquée observée chez le virus PI isolé de cellules de fibrosarcome humain HT1080. La position de la région de fixation aux acides sialiques [43] est aussi indiquée (trait vert).

semblable à la situation des cellules L929 [63]. Les études n'ont toutefois pas été poursuivies en vue de mieux caractériser les virus et les cellules obtenus. Ces résultats sont aussi un peu étonnants, étant donné que des travaux subséquents ont démontré que ces cellules étaient difficilement infectées, faute de récepteur protéique pour le virus [64, 65]. Encore là, une différence dans la nature exacte des lignées utilisées dans ces différentes études explique sans doute ces différences. Il demeure que le principe général de coévolution virus-cellules semble bien s'appliquer dans ce modèle cellulaire.

Le rôle de l'interféron dans la persistance virale

Le rôle de l'interféron dans la persistance du réovirus reste incertain. Dans les cellules SC1, la persistance virale est associée à une sécrétion constante d'interféron et à l'activation permanente de PKR [66, 67]. Cependant, dans ces cellules, l'interféron n'est pas protecteur et cet aspect n'a pas été étudié dans d'autres lignées cellulaires infectées de manière persistante. La persistance virale a également

été établie dans les cellules Vero qui sont déficientes en synthèse d'interféron. L'hypothèse de départ était que cela devrait permettre au virus d'évoluer, indépendamment de la contrainte de maintien d'un certain niveau de résistance à l'interféron. En conséquence, on s'attendait à ce que le virus résultant soit plus sensible à l'interféron, ce qui a été effectivement le cas. La petite protéine non structurale $\sigma 1s$ codée par le gène *SI* s'est révélée être un nouveau déterminant viral de la sensibilité à l'interféron, indépendamment d'un effet apparent sur l'induction de la synthèse ou sécrétion d'interféron [8].

Autres réflexions sur les mécanismes de l'infection persistante par le réovirus

L'établissement de la persistance du virus est facilité lorsque des virus ou des conditions expérimentales « atténués », comme l'ajout d'un inhibiteur de la décapsulation, sont utilisés. L'établissement de la persistance virale est aussi facilité en utilisant des virus thermosensibles ou des conditions dans lesquelles une constellation de mutants viraux sera présente dès le départ, par exemple en utilisant des stocks de virus à passage élevé [31, 48, 68-71].

Comme pour beaucoup de virus eucaryotes, le(s) mécanisme(s) exact(s) conduisant à la lyse cellulaire demeure(nt) peu connu(s) et pourrai(en)t impliquer plus d'une étape du cycle viral de multiplication. Certains types de cellules sont également connus pour être permissifs pour la répllication du réovirus tout en restant viables et en libérant des virus infectieux. Cela a été observé pour une lignée de cellules de chauves-souris [22] ainsi que pour des cellules endothéliales et épithéliales [2, 3]. L'utilisation d'un mécanisme de transport vésiculaire ne peut être exclue pour cette libération sans lyse cellulaire, surtout à la suite des observations récentes montrant le remodelage des membranes cellulaires internes au niveau des inclusions virales dans les cellules infectées par le réovirus [72]. Une autre possibilité est que le réovirus puisse exploiter la machinerie d'autophagie. En effet, au cours des dernières années, des exemples se sont accumulés concernant l'exploitation de la machinerie d'autophagie par des virus, cytolitiques ou non, pour leur assemblage ou leur libération de cellules infectées [73-77]. Plus récemment, la participation de l'autophagie dans l'activité oncolytique de réovirus, au moins dans certains types de cellules, a aussi été rapportée [78, 79]. Il est donc possible qu'un tel transport par la machinerie d'autophagie puisse être exploité par le réovirus pour une libération non lytique, comme elle se produit chez les cellules infectées de manière persistante. En fait, l'examen en microscopie électronique de cellules infectées de manière persistante a révélé la présence de particules

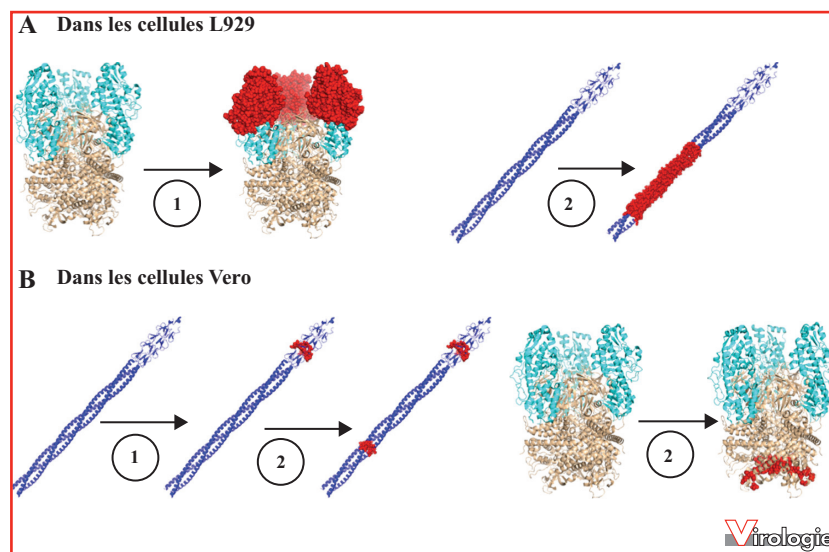


Figure 5. Représentation schématique des étapes présumées d'établissement et de maintien de la persistance. A) Dans les cellules L929, des changements dans la région externe de la protéine $\sigma 3$ (en rouge) au sein de l'hétérohexamère de $\sigma 3$ - $\mu 1$ semblent essentiels à l'établissement de la persistance virale (1). Des changements subséquents au niveau de la région hélicoïdale (en rouge) de la protéine de fixation $\sigma 1$ apparaîtraient par la suite (2). **B)** Dans les cellules Vero, les premiers changements apparaissent au niveau de la région de fixation aux acides sialiques sur la protéine $\sigma 1$ (en rouge) (1) et sont suivis d'autres changements (en rouge) au niveau de $\sigma 1$ et de $\mu 1$ au sein de l'hétérohexamère $\sigma 3$ - $\mu 1$ (2). Plus de détails sont présentés dans le texte.

virales dans des vésicules, certaines pouvant ressembler morphologiquement à des autophagosomes [17, 23, 29, 66]. Cependant, la nature exacte de ces vésicules n'est pas clairement établie. Une activation permanente de PKR lors de la persistance du réovirus a aussi été notée précédemment [66] ; une telle activité PKR pourrait entraîner une augmentation de l'autophagie [80], contribuant ainsi à la libération des particules virales indépendamment de la lyse cellulaire. Tous les exemples décrits d'infection persistante par le réovirus nécessitent une réinfection virale constante. Cela implique que le virus complète son cycle de réplication et que les virions libérés soient infectieux. Cela explique que lors d'une exposition assez longue des cellules infectées à des anticorps neutralisants, les cellules sont guéries à un niveau indétectable de production virale, le retrait des anticorps n'amenant pas un retour de production virale. Des travaux plus anciens avaient suggéré un modèle de la persistance dans lequel l'établissement et le maintien de la persistance sont des phénomènes distincts reposant sur des changements génétiques différents et graduels au sein des virus PI. Dans le modèle initial, des changements au niveau de la protéine $\sigma 3$ étaient vus comme étant essentiels à l'établissement de la persistance, comme discuté plus haut. Au contraire, le maintien de la persistance semblait reposer davantage sur l'apparition de changements au niveau de la protéine $\sigma 1$ [32, 71]. À noter que certaines de ces études ont suggéré que la protéine $\lambda 2$ puisse aussi être impliquée dans

l'établissement de la persistance virale. La protéine agirait en favorisant l'apparition de mutations au sein de la population virale utilisée pour l'établissement de la persistance [71]. Bien que la présence de mutations fréquentes au sein de la population de virus puisse certainement être un facteur favorisant l'établissement de la persistance, un rôle de la protéine $\lambda 2$ semble peu probable ; l'idée que cette protéine puisse agir comme la polymérase virale n'est plus compatible avec nos connaissances actuelles sur la transcription et la réplication du génome viral [11].

Dans le modèle des cellules Vero, la substitution d'acides aminés de la protéine $\sigma 1$, permettant l'adaptation du virus aux cellules, apparaît dans un premier temps. Par la suite, le changement de $\sigma 1$ s responsable de la sensibilité à l'interféron et les changements de $\mu 1$ vont apparaître [48]. On peut donc conclure que des changements dits de « maintien » ne seraient pas directement reliés à la persistance en tant que telle, mais plutôt un résultat indirect de la croissance dans un type donné de cellules. L'ordre et la nature des changements observés chez les cellules L929 et les cellules Vero sont résumés schématiquement sur la figure 5.

Importance *in vivo*

Peu de travaux ont été consacrés aux infections persistantes à réovirus *in vivo*. Par le passé, certains travaux ont démon-

tré l'apparition de mutants viraux sélectionnés *in vivo*. De plus, des cellules d'hybridome obtenues après inoculation du virus peuvent être infectées de manière persistante et être guéries *in vitro* par traitement à l'aide d'un antisérum neutralisant [81, 82]. Tous ces différents virus PI n'ont pas été davantage étudiés.

Par ailleurs, l'inoculation de virus PI récupéré de cellules L929 semblait indiquer une plus grande virulence de ceux-ci, du moins lors d'inoculation intracérébrale [83, 84]. Finalement, des cellules de lignées tumorales guéries de leur infection persistante *in vitro* demeurent sensibles à un virus sauvage dans le contexte de tumeurs *in vivo*, et ce bien qu'elles soient effectivement résistantes *in vitro* ; les cellules infectées de manière persistante sont, elles, incapables de former des tumeurs [60, 61]. De toute évidence, ces différents aspects de la persistance *in vivo* mériteraient d'être davantage étudiés.

La persistance virale comme outil de sélection de nouveaux réovirus

L'évolution *in vitro* ou l'adaptation des virus à un type de cellules donné est non seulement très instructive d'un point de vue fondamental, mais représente un outil potentiel pour produire de nouveaux virus. La sélection ou la construction de nouveaux réovirus mieux adaptés en tant qu'agents virothérapeutiques, vecteurs de gènes, vaccins ou virus oncolytiques a été proposée par plusieurs auteurs [6, 7, 26, 62, 85-89]. En fait, un virus PI sélectionné sur une lignée de cellules tumorales démontre par la suite une atténuation chez les cellules normales, sans altérer son infectivité ou la cytolyse de cellules transformées [62]. Par contre, dans ce cas particulier, une délétion d'une partie de la protéine $\sigma 1$ a été observée plutôt que des substitutions d'acides aminés.

Le passage en série des virus ou la sélection de clones viraux sont deux approches possibles pour la sélection de nouveaux virus présentant des caractéristiques phénotypiques souhaitables [26, 89, 90]. Cependant, l'interaction à long terme nécessaire pour établir et maintenir la persistance représente un nombre impressionnant de cycles viraux qui ne peut être facilement atteint par ces autres approches. En outre, l'apparition graduelle de la résistance cellulaire est sans doute un stimulant de l'évolution virale dans ce contexte, par rapport au passage en série, bien que cette dernière approche se traduise probablement par un autre type de pression sélective.

L'obtention de virus PI de différents types cellulaires, couplée au séquençage du génome de ces virus et à la confirmation de l'importance des substitutions grâce à la génétique inverse, devrait permettre une meilleure

compréhension du phénomène de persistance et de coévolution virus-cellule. Il serait certainement aussi intéressant d'isoler des virus à différents stades de l'établissement de persistance afin de mieux déterminer la nature des changements directement reliés et de mieux comprendre le phénomène de coévolution, dans différentes cellules.

Conclusions

En dépit du fait que le phénomène de persistance virale par le réovirus a été décrit depuis plus de 40 ans, l'étude des mécanismes sous-jacents demeure d'actualité. Premièrement, de telles études peuvent permettre une meilleure compréhension de la biologie du virus au sein de divers types cellulaires. Deuxièmement, ces études pourraient à plus long terme permettre d'isoler de nouveaux variants viraux pouvant être utilisés en virothérapie anticancéreuse ou dans d'autres applications.

Remerciements. Le travail exécuté dans le laboratoire de l'auteur est actuellement financé par le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie (CRSNG) du Canada. L'auteur souhaite également remercier le personnel et les nombreux étudiants et stagiaires qui ont participé au travail du laboratoire au cours des années.

Liens d'intérêts : l'auteur déclare ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

1. Heaton NS. Revisiting the concept of a cytopathic viral infection. *PLoS Pathog* 2017 ; 13 : e1006409-16.
2. Excoffon KJDA, Guglielmi KM, Wetzel JD, *et al.* Reovirus preferentially infects the basolateral surface and is released from the apical surface of polarized human respiratory epithelial cells. *J Infect Dis* 2008 ; 197 : 1189-97.
3. Lai CM, Mainou BA, Kim KS, Dermody TS. Directional release of reovirus from the apical surface of polarized endothelial cells. *MBio* 2013 ; 4 : e00049-13.
4. Lee P, Clements D, Helson E, Gujar S. Reovirus in cancer therapy: an evidence-based review. *Oncolytic Virother* 2014 ; 3 : 69-82.
5. Chakrabarty R, Tran H, Selvaggi G, Hagerman A, Thompson B, Coffey M. The oncolytic virus, pelareorep, as a novel anticancer agent: a review. *Invest New Drugs* 2015 ; 33 : 761-74.
6. Mohamed A, Johnston R, Shmulevitz M. Potential for improving potency and specificity of reovirus oncolysis with next-generation reovirus variants. *Viruses* 2015 ; 7 : 6251-78.
7. Kemp V, Hoeben R, van den Wollenberg D. Exploring reovirus plasticity for improving its use as oncolytic virus. *Viruses* 2016 ; 8 : 4-16.
8. Lanoie D, Côté S, Degeorges E, Lemay G. A single mutation in the mammalian orthoreovirus S1 gene is responsible for increased interferon sensitivity in a virus mutant selected in Vero cells. *Virology* 2019 ; 528 : 73-9.

9. Sandekian V, Lemay G. Amino acids substitutions in $\sigma 1$ and $\mu 1$ outer capsid protein of a Vero cell-adapted mammalian orthoreovirus are required for optimal virus binding and disassembly. *Virus Res* 2015 ; 196 : 20-9.
10. Dermody TS, Parker JSL, Sherry B. Orthoreoviruses. In : Knipe DM, Howley PM, eds. *Field's virology*. Philadelphia : Lippincot, Williams and Wilkins, 2013.
11. Lemay G. Synthesis and translation of viral mRNA in reovirus-infected cells: progress and remaining questions. *Viruses* 2018 ; 10 : 671-725.
12. Danthi P, Guglielmi KM, Kirchner E, Mainou B, Stehle T, Dermody TS. From touchdown to transcription: the reovirus cell entry pathway. *Curr Top Microbiol Immunol* 2010 ; 343 : 91-119.
13. Sutherland DM, Aravamudhan P, Dermody TS. An orchestra of reovirus receptors: still searching for the conductor. *Adv Virus Res* 2018 ; 100 : 1-24.
14. Golden JW, Linke J, Schmechel S, Thoenke K, Schiff LA. Addition of exogenous protease facilitates reovirus infection in many restrictive cells. *J Virol* 2002 ; 76 : 7430-43.
15. Alain T, Kim TS, Lun X, et al. Proteolytic disassembly is a critical determinant for reovirus oncolysis. *Mol Ther* 2007 ; 15 : 1512-21.
16. Nygaard RM, Lahti L, Boehme KW, et al. Genetic determinants of reovirus pathogenesis in a murine model of respiratory infection. *J Virol* 2013 ; 87 : 9279-89.
17. Wetzel JD, Chappell JD, Fogo AB, Dermody TS. Efficiency of viral entry determines the capacity of murine erythroleukemia cells to support persistent infections by mammalian reoviruses. *J Virol* 1997 ; 71 : 299-306.
18. Marcatò P, Shmulevitz M, Pan D, Stoltz D, Lee PW. Ras transformation mediates reovirus oncolysis by enhancing virus uncoating, particle infectivity, and apoptosis-dependent release. *Mol Ther* 2007 ; 15 : 1522-30.
19. Olland AM, Jané-Valbuena J, Schiff LA, Nibert ML, Harrison SC. Structure of the reovirus outer capsid and dsRNA-binding protein $\sigma 3$ at 1.8Å resolution. *EMBO J* 2001 ; 20 : 979-89.
20. Liemann S, Chandran K, Baker TS, Nibert ML, Harrison SC. Structure of the reovirus membrane-penetration protein, $\mu 1$, in a complex with its protector protein, $\sigma 3$. *Cell* 2002 ; 108 : 283-95.
21. Zhang X, Ji Y, Zhang L, et al. Features of reovirus outer capsid protein $\mu 1$ revealed by electron cryomicroscopy and image reconstruction of the virion at 7.0Å resolution. *Structure* 2005 ; 13 : 1545-57.
22. Sandekian V, Lim D, Prud'homme P, Lemay G. Transient high level mammalian reovirus replication in a bat epithelial cell line occurs without cytopathic effect. *Virus Res* 2013 ; 173 : 327-35.
23. Montgomery LB, Kao CY, Verdin E, Cahill C, Maratos-Flier E. Infection of a polarized epithelial cell line with wild-type reovirus leads to virus persistence and altered cellular function. *J Gen Virol* 1991 ; 72 : 2939-46.
24. Verdin EM, Maratos-Flier E, Carpentier JL, Kahn CR. Persistent infection with a nontransforming RNA virus leads to impaired growth factor receptors and response. *J Cell Physiol* 1986 ; 128 : 457-65.
25. Strong JE, Coffey MC, Tang D, Sabinin P, Lee PW. The molecular basis of viral oncolysis: usurpation of the Ras signaling pathway by reovirus. *EMBO J* 1998 ; 17 : 3351-62.
26. Rudd P, Lemay G. Correlation between interferon sensitivity of reovirus isolates and ability to discriminate between normal and Ras-transformed cells. *J Gen Virol* 2005 ; 86 : 1489-97.
27. Dermody TS. Molecular mechanisms of persistent infection by reovirus. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998 ; 233 : 1-22.
28. Ahmed R, Canning WM, Kauffman RS, Sharpe AH, Hallum JV, Fields BN. Role of the host cell in persistent viral infection: coevolution of L cells and reovirus during persistent infection. *Cell* 1981 ; 25 : 325-32.
29. Baer GS, Ebert DH, Chung CJ, Erickson AH, Dermody TS. Mutant cells selected during persistent reovirus infection do not express mature cathepsin L and do not support reovirus disassembly. *J Virol* 1999 ; 73 : 9532-43.
30. Ebert DH, Kopecky-Bromberg SA, Dermody TS. Cathepsin B is inhibited in mutant cells selected during persistent reovirus infection. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 3837-51.
31. Ahmed R, Fields BN. Role of the S4 gene in the establishment of persistent reovirus infection in L cells. *Cell* 1982 ; 28 : 605-12.
32. Kauffman RS, Ahmed R, Fields BN. Selection of a mutant S1 gene during reovirus persistent infection of L cells: role in maintenance of the persistent state. *Virology* 1983 ; 131 : 79-87.
33. Baer GS, Dermody TS. Mutations in reovirus outer-capsid protein $\sigma 3$ selected during persistent infections of L cells confer resistance to protease inhibitor E64. *J Virol* 1997 ; 71 : 4921-8.
34. Wetzel JD, Wilson GJ, Baer GS, et al. Reovirus variants selected during persistent infections of L cells contain mutations in the viral S1 and S4 genes and are altered in viral disassembly. *J Virol* 1997 ; 71 : 1362-9.
35. Ebert DH, Wetzel JD, Brumbaugh DE, et al. Adaptation of reovirus to growth in the presence of protease inhibitor E64 segregates with a mutation in the carboxy terminus of viral outer-capsid protein $\sigma 3$. *J Virol* 2001 ; 75 : 3197-206.
36. Wilson GJ, Nason EL, Hardy CS, et al. A single mutation in the carboxy terminus of reovirus outer-capsid protein $\sigma 3$ confers enhanced kinetics of $\sigma 3$ proteolysis, resistance to inhibitors of viral disassembly, and alterations in $\sigma 3$ structure. *J Virol* 2002 ; 76 : 9832-43.
37. Clark KM, Wetzel JD, Gu Y, et al. Reovirus variants selected for resistance to ammonium chloride have mutations in viral outer-capsid protein $\sigma 3$. *J Virol* 2006 ; 80 : 671-81.
38. Doyle JD, Danthi P, Kendall EA, Ooms LS, Wetzel JD, Dermody TS. Molecular determinants of proteolytic disassembly of the reovirus outer capsid. *J Biol Chem* 2012 ; 287 : 8029-38.
39. Schiff LA. Structure and functions of the orthoreovirus $\sigma 3$ protein. In : Patton JT, ed. *Segmented double-stranded RNA viruses: structure and molecular biology*. Bethesda : Caister Academic Press, 2008.
40. Doyle JD, Stencel-Baerenwald JE, Copeland CA, et al. Diminished reovirus capsid stability alters disease pathogenesis and littermate transmission. *PLoS Pathog* 2015 ; 11 : e1004693-724.
41. Wilson GJ, Wetzel JD, Puryear W, Bassel-Duby R, Dermody TS. Persistent reovirus infections of L cells select mutations in viral attachment protein $\sigma 1$ that alter oligomer stability. *J Virol* 1996 ; 70 : 6598-606.
42. Dietrich MH, Ogden KM, Long JM, et al. Structural and functional features of the reovirus $\sigma 1$ tail. *J Virol* 2018 ; 92 : e00336-418.
43. Reiter DM, Frierson JM, Halvorson EE, Kobayashi T, Dermody TS, Stehle T. Crystal structure of reovirus attachment protein $\sigma 1$ in complex with sialylated oligosaccharides. *PLoS Pathog* 2011 ; 7 : e1002166.
44. Chew T, Noyce R, Collins SE, Hancock MH, Mossman KL. Characterization of the interferon regulatory factor 3-mediated antiviral response in a cell line deficient for IFN production. *Mol Immunol* 2009 ; 46 : 393-9.
45. Desmyter J, Melnick JL, Rawls WE. Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero). *J Virol* 1968 ; 2 : 955-61.
46. Emery JM, Morgan MJ. Regulation of the interferon system – evidence that Vero cells have a genetic defect in interferon production. *J Gen Virol* 1979 ; 43 : 247-52.
47. Park S, Choi J, Kang J, et al. Attenuated expression of interferon-induced protein kinase PKR in a simian cell devoid of type I interferons. *Mol Cells* 2006 ; 21 : 21-8.
48. Jabre R, Sandekian V, Lemay G. Amino acid substitutions in $\sigma 1$ and $\mu 1$ outer capsid proteins are selected during mammalian reovirus adaptation to Vero cells. *Virus Res* 2013 ; 176 : 188-98.
49. Lanoie D, Lemay G. Characterization of the different reovirus proteins involved in viral adaptation to Vero cells during viral persistence [in preparation].
50. Sarkar P, Danthi P. The $\mu 1$ 72-96 loop controls conformational transitions during reovirus cell entry. *J Virol* 2013 ; 87 : 13532-42.
51. Snyder AJ, Danthi P. Cleavage of the C-terminal fragment of reovirus $\mu 1$ is required for optimal infectivity. *J Virol* 2018 ; 92 : e01848-1917.
52. Thete D, Snyder AJ, Mainou BA, Danthi P. Reovirus $\mu 1$ protein affects infectivity by altering virus-receptor interactions. *J Virol* 2016 ; 90 : 10951-62.

53. Thete D, Danthi P. Protein mismatches caused by reassortment influence functions of the reovirus capsid. *J Virol* 2018 ; 92 : e00858-918.
54. Derrien M, Hooper JW, Fields BN. The M2 gene segment is involved in the capacity of reovirus type 3 Abney to induce the oily fur syndrome in neonatal mice, a S1 gene segment-associated phenotype. *Virology* 2003 ; 305 : 25-30.
55. Tyler KL, Squier MKT, Brown AL, *et al.* Linkage between reovirus-induced apoptosis and inhibition of cellular DNA synthesis: role of the S1 and M2 genes. *J Virol* 1996 ; 70 : 7984-91.
56. Hrdy DB, Rubin DH, Fields BN. Molecular basis of reovirus neurovirulence: role of the M2 gene in avirulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982 ; 79 : 1298-302.
57. Clarke P, Meintzer SM, Widmann C, Johnson GL, Tyler KL. Reovirus infection activates JNK and the JNK-dependent transcription factor c-Jun. *J Virol* 2001 ; 75 : 11275-83.
58. Rodgers SE, Barton ES, Oberhaus SM, *et al.* Reovirus-induced apoptosis of MDCK cells is not linked to viral yield and is blocked by Bcl-2. *J Virol* 1997 ; 71 : 2540-6.
59. Danis C, Lemay G. Protein synthesis in different cell lines infected with orthoreovirus serotype 3: inhibition of host-cell protein synthesis correlates with accelerated viral multiplication and cell killing. *Biochem Cell* 1993 ; 71 : 81-5.
60. Alain T, Kim M, Johnston RN, *et al.* The oncolytic effect *in vivo* of reovirus on tumour cells that have survived reovirus cell killing *in vitro*. *Br J Cancer* 2006 ; 95 : 1020-7.
61. Kim M, Egan C, Alain T, *et al.* Acquired resistance to reoviral oncolysis in Ras-transformed fibrosarcoma cells. *Oncogene* 2007 ; 26 : 4124-34.
62. Kim M, Garant KA, zur Nieden NI, *et al.* Attenuated reovirus displays oncolysis with reduced host toxicity. *Br J Cancer* 2011 ; 104 : 290-9.
63. Taber R, Alexander V, Whitford W. Persistent reovirus infection of CHO cells resulting in virus resistance. *J Virol* 1976 ; 17 : 513-24.
64. Barton ES, Forrest JC, Connolly JL, *et al.* Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus. *Cell* 2001 ; 104 : 441-51.
65. Konopka-Anstadt JL, Mainou BA, Sutherland DM, Sekine Y, Strittmatter SM, Dermody TS. The Nogo receptor NgR1 mediates infection by mammalian reovirus. *Cell Host Microbe* 2014 ; 15 : 681-91.
66. Danis C, Mabrouk T, Garzon S, Lemay G. Establishment of persistent reovirus infection in SC1 cells: absence of protein synthesis inhibition and increased level of double-stranded RNA-activated protein kinase. *Virus Res* 1993 ; 27 : 253-65.
67. Danis C, Mabrouk T, Faure M, Lemay G. Interferon has no protective effect during acute or persistent reovirus infection of mouse SC1 fibroblasts. *Virus Res* 1997 ; 51 : 139-49.
68. Ahmed R, Graham AF. Persistent infections in L cells with temperature-sensitive mutants of reovirus. *J Virol* 1977 ; 23 : 250-62.
69. Dermody TS, Nibert ML, Wetzel JD, Tong X, Fields BN. Cells and viruses with mutations affecting viral entry are selected during persistent infections of L cells with mammalian reoviruses. *J Virol* 1993 ; 67 : 2055-63.
70. Canning WM, Fields BN. Ammonium chloride prevents lytic growth of reovirus and helps to establish persistent infection in mouse L cells. *Science* 1983 ; 219 : 987-8.
71. Brown EG, Nibert ML, Fields BN. The L2 gene of reovirus serotype 3 controls the capacity to interfere, accumulate deletions and establish persistent infection. In: Compans RW, Bishop DHL, eds. *Double-stranded RNA viruses*. New York : Elsevier Biomedical, 1983.
72. Fernandez de Castro I, Zamora PF, Ooms L, *et al.* Reovirus forms neo-organelles for progeny particle assembly within reorganized cell membranes. *MBio* 2013 ; 5 : e00931-1013.
73. Bird SW, Maynard ND, Covert MW, Kirkegaard K. Nonlytic viral spread enhanced by autophagy components. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014 ; 111 : 13081-6.
74. Bird SW, Kirkegaard K. Escape of non-enveloped virus from intact cells. *Virology* 2015 ; 479-480 : 444-9.
75. Jackson WT. Viruses and the autophagy pathway. *Virology* 2015 ; 479-480 : 450-6.
76. Münz C. Autophagy proteins in viral exocytosis and anti-viral immune responses. *Viruses* 2017 ; 9 : 288-310.
77. Münz C. The autophagic machinery in viral exocytosis. *Front Microbiol* 2017 ; 8 : 461-8.
78. Kemp V, Dautzenberg I, Limpens R, van den Wollenberg D, Hoeben R. Oncolytic reovirus infection is facilitated by the autophagic machinery. *Viruses* 2017 ; 9 : 266-315.
79. Thirukkumaran CM, Shi ZQ, Luider J, *et al.* Reovirus modulates autophagy during oncolysis of multiple myeloma. *Autophagy* 2013 ; 9 : 413-4.
80. Talloczy Z, Jiang WX, Virgin HW, *et al.* Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2 α kinase signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 ; 99 : 190-5.
81. Matsuzaki N, Hinshaw VS, Fields BN, Greene MI. Cell receptors for the mammalian reovirus: reovirus-specific T-cell hybridomas can become persistently infected and undergo autoimmune stimulation. *J Virol* 1986 ; 60 : 259-66.
82. Dermody TS, Chappell JD, Hoffer JG, Kramp W, Tyler KL. Eradication of persistent reovirus infection from a B-cell hybridoma. *Virology* 1995 ; 212 : 272-6.
83. Haller BL, Barkon ML, Li XY, *et al.* Brain- and intestine-specific variants of reovirus serotype 3 strain Dearing are selected during chronic infection of severe combined immunodeficient mice. *J Virol* 1995 ; 69 : 3933-7.
84. Morrison LA, Fields BN, Dermody TS. Prolonged replication in the mouse central-nervous-system of reoviruses isolated from persistently infected cell-cultures. *J Virol* 1993 ; 67 : 3019-26.
85. Brochu-Lafontaine V, Lemay G. Addition of exogenous polypeptides on the mammalian reovirus outer capsid using reverse genetics. *J Virol Methods* 2012 ; 179 : 342-50.
86. Rouault É, Lemay G. Incorporation of epitope-tagged viral σ 3 proteins to reovirus virions. *Can J Microbiol* 2003 ; 49 : 407-17.
87. Demidenko AA, Blattman JN, Blattman NN, Greenberg PD, Nibert ML. Engineering recombinant reoviruses with tandem repeats and a tetra-virus 2A-like element for exogenous polypeptide expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013 ; 110 : e1867-76.
88. Boehme KW, Ikizler M, Iskarpatyoti JA, *et al.* Engineering recombinant reoviruses to display gp41 membrane-proximal external-region epitopes from HIV-1. *mSphere* 2016 ; 1 : e00086-16.
89. Shmulevitz M, Gujar SA, Ahn DG, Mohamed A, Lee PWK. Reovirus variants with mutations in genome segments S1 and L2 exhibit enhanced virion infectivity and superior oncolysis. *J Virol* 2012 ; 86 : 7403-13.
90. van den Wollenberg DJM, Dautzenberg IJC, van den Hengel SK, Cramer SJ, de Groot RJ, Hoeben RC. Isolation of reovirus T3D mutants capable of infecting human tumor cells independent of junction adhesion molecule-A. *PLoS One* 2012 ; 7 : e48064.