

La virothérapie oncolytique médiée par le virus de la myxomatose

KRYGIER D., GILLET L.¹, MARLIER D.²

¹ Département des Maladies infectieuses et parasitaires, Laboratoire d'Immunologie-Vaccinologie, bâtiment B43bis

² Clinique aviaire, des Rongeurs et des Lagomorphes, Département clinique des Animaux de Compagnie et des Équidés, bâtiment B42

Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster, 20, 4000 Liège, Belgique

Correspondance : Prof. D. Marlier - Email : dmarlier@ulg.ac.be

RÉSUMÉ : Le virus de la myxomatose est un poxvirus du genre *Leporipoxvirus* qui induit une pathologie spécifique, la myxomatose, chez le lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*). Ce virus a la particularité d'être non pathogène pour les autres espèces de vertébrés y compris l'homme. Le virus de la myxomatose (MYXV) présente aussi, de manière inattendue, un tropisme pour les cellules cancéreuses humaines *in vitro* ainsi qu'un potentiel oncolytique *in vivo*. La tolérance de ces cellules au MYXV est intimement liée au niveau intracellulaire d'Akt phosphorylée. Cette enzyme, est une serine/thréonine protéine kinase qui joue un rôle essentiel dans de nombreux processus cellulaires et fait partie de la voie de signalisation PI3k/Akt/mTOR (*mammalian target of rapamycin*), fréquemment amplifiée par l'oncogénèse. La protéine virale à répétitions ankyrines, M-T5, interagit avec Akt ce qui module le tropisme du MYXV pour les cellules tumorales humaines. Un régulateur de la croissance cellulaire et du métabolisme situé en aval d'Akt, mTOR, est spécifiquement inhibé par la rapamycine. Ainsi, l'utilisation de la rapamycine en combinaison avec le MYXV permet d'augmenter la concentration d'Akt phosphorylée, et par conséquent, d'amplifier l'oncolyse. Un meilleur contrôle chimique de la voie de signalisation d'Akt ou de la modification génétique de son génome constituera une étape décisive pour que le MYXV devienne l'un des nouveaux traitements des cancers chez l'homme.

INTRODUCTION

Avec plusieurs dizaines de millions de nouveaux cas chaque année et en dépit de dépistages toujours plus précoces, le cancer est l'une des maladies les plus dévastatrices pour l'humanité. De part la multiplicité des étiologies et des types de cancers, l'existence d'un traitement unique actif sur tous les cas et capable de les guérir ou, à défaut, de les stabiliser est utopique. Dans ce cadre, la recherche de nouveaux traitements toujours plus efficaces est permanente. Parmi ces nouvelles thérapies, la virothérapie semble très prometteuse.

La « virothérapie oncolytique » se définit comme l'utilisation d'un virus pour cibler et détruire des cellules cancéreuses. Cette nouvelle forme de traitement repose sur l'observation

qu'une infection virale pouvait avoir un effet positif sur la régression des tumeurs (Dock, 1904).

L'efficacité d'une telle thérapie va dépendre du type de virus utilisé, l'« agent oncolytique idéal » se présentant comme un virus qui possède un tropisme hautement sélectif pour le tissu tumoral ainsi qu'une incapacité à causer une infection significative dans les tissus sains de l'hôte. D'autres propriétés comme la possibilité de facilement modifier le génome viral et, surtout, d'être totalement non pathogène pour l'homme sont primordiales pour être utilisé comme thérapie chez ce dernier (Lun *et al.*, 2007).

Il existe plusieurs virus qui correspondent à cette définition tels que

les adénovirus, les herpèsvirus, les réovirus, le virus de la rougeole, le virus de la vaccine, ces virus étant des candidats potentiels pour être utilisés comme traitement oncolytique. Dans la plupart des cas, ces virus oncolytiques utilisés sont des souches spontanément atténuées ou modifiées génétiquement afin de les rendre les plus inoffensives possibles pour les tissus sains de l'hôte (Gillet *et al.*, 2005). Récemment, les recherches sur le virus de la myxomatose (MYXV) semblent indiquer que ce virus pourrait également être utilisé dans ce cadre (Sypula *et al.*, 2004).

Le MYXV est un poxvirus, appartenant à la famille des *Poxviridae*, à la sous-famille des *Chordopoxvirinae*, genre *Leporipoxvirus*. Les hôtes naturels du MYXV sont les lapins

américains du genre *Sylvilagus* chez lesquels la maladie est bénigne. Le MYXV possède la particularité d'être un virus spécifique des léporidés, non pathogène pour les autres espèces de vertébrés, incluant l'homme (McFadden, 2005). La myxomatose peut se présenter sous deux formes cliniques, la forme « nodulaire classique » et la forme « amyxomateuse ». La forme nodulaire classique est une maladie très sévère entraînant l'apparition sur l'animal de lésions cutanées, nommées myxomes, suivi de la mort de l'animal dans les dix jours qui suivent l'infection. Des formes nodulaires plus atténuées sont également observées avec des taux de mortalités moindres et une évolution clinique plus lente, le dessèchement progressif des myxomes laissant apparaître des lésions cicatricielles cutanées. La forme amyxomateuse diffère des formes nodulaires de part une

expression cutanée très réduite, voire absente. Dans les deux formes, une détresse respiratoire sévère est souvent observée suite au développement de complications bactériennes secondaires pulmonaires faisant suite à l'intense immunosuppression induite chez l'hôte par la multiplication virale (Marlier *et al.*, 2001).

La myxomatose se transmet par contacts directs ou indirects, le plus souvent via des insectes piqueurs qui lors d'un repas sanguin vont permettre au MYXV d'infecter directement les cellules dendritiques présentes dans le derme. Celles-ci migrent alors jusqu'au nœud lymphatique dans lequel le MYXV infecte principalement les lymphocytes T de la région paracorticale, ce qui conduit à une très forte réduction du nombre de lymphocytes T, plus particulièrement

les LTCD4+. La réplication du virus entraîne une réduction massive de ces cellules ce qui explique la chute brutale de l'immunité et la surinfection bactérienne fatale qui s'en suit (Stanford *et al.*, 2007b).

Comme tous les poxvirus, le MYXV se réplique exclusivement dans le cytoplasme de la cellule hôte. Le MYXV est un virus de grande taille (286 X 230 X 75 nm) qui possède un génome de grande taille, d'environ 162 kilo-paires de bases facilement modifié tant par délétion de gènes d'intérêts que par insertion de gènes eucaryotes dans un but vaccinal (Bertagnoli *et al.*, 1996) ou thérapeutique (Johnston et McFadden, 2004).

De nombreuses protéines sont synthétisées par le MYXV (tableau I). Parmi

Tableau I : liste des virokines, des virorécepteurs et des protéines virales impliquées dans la tolérance de la cellule hôte et dans le contrôle de l'action des macrophages et des lymphocytes T, d'après Stanford et collaborateurs (2007b)

Cytokine	Gènes-Protéines	Propriétés/fonctions	Requis pour l'infection	
			<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
Virokines et Virorécepteurs	MT1	liaison et inhibition des propriétés chemo-tactiques des chemokines	N	N
	MT2	récepteurs homologues de TNF	uniquement RL5	O
	MT7	récepteurs homologues d'IFN γ	N	O
	SERP1	sécrétion de Serpine	N	O
	MGF	facteur de croissance	N	O
Facteurs anti-apoptotiques	MT4	régulateur de l'apoptose	uniquement RL5	O
	MT5	protéine à répétitions ankyrines et inhibiteur du cycle cellulaire/apoptose	RL5 et cellules cancéreuses	O
	M11L	protéines membranaires et régulateur de l'apoptose	uniquement RL5	O
	SERP2	serpine intracellulaire	N	O
Modulateurs de l'immunité	vOx2/vCD200	domaines d'immunoglobines et homologues OX2	N	O
	vCD47	protéines associées aux intégrines et homologues CD47	N	O
	MNF	protéines à répétitions ankyrines et inhibiteur de NF κ B	N	O
	M13L	inhibiteur de la pyrine contenant l'inflammation	uniquement RL5	O
	SERP-3	facteur de virulence, serpine virale	N	O
	MV-LAP	promoteur de la régulation en aval du CMH1 et de CD4 sur les cellules T	N	N

O ou N : infection possible (O) ou non (N) dans les cellules testées

celles-ci, une (MT5) module à la fois sa virulence et son tropisme cellulaire. Cette protéine anti-apoptotique appartient au groupe de protéines possédant des répétitions ankyrines, séquences impliquées dans les interactions protéine-protéine. Après délétion du gène codant pour la MT5, les virus délétés possèdent *in vitro* une infectiosité très réduite vis-à-vis des cellules RL-5 et des cellules cancéreuses et *in vivo* une virulence très atténuée envers les lapins infectés par rapport au virus sauvage (Werden et McFadden, 2008). Au niveau moléculaire, la protéine MT5 se fixe, au moins, à deux protéines cellulaires distinctes : Akt et cullin1. L'interaction entre MT5 et Akt est la base du tropisme du MYXV pour les cellules cancéreuses humaines, faisant de ce dernier un excellent candidat oncolytique.

Facteurs de spectre d'hôte et de permissivité

Les mécanismes moléculaires contrôlant le spectre d'hôte et la permissivité du MYXV ne sont toujours pas totalement connus et diffèrent lors de l'infection d'une cellule normale ou d'une cellule cancéreuse (McFadden, 2005).

Le spectre d'hôte limité aux léporidés

Les premières études portant sur les risques d'infection de l'homme remontent aux années '60 suite à l'épidémie californienne de myxomatose de 1963. L'absence de séroconversions humaines vis-à-vis du MYXV a conduit à la conclusion que ce dernier n'infectait pas l'homme même si la raison de ce spectre d'hôte sélectif ne pouvait être expliquée (Jackson *et al.*, 1966). Depuis, les études fondamentales sur le MYXV ont conduit à proposer la cascade de signalisation de l'interféron de type 1 comme étant responsable de la barrière d'espèce du MYXV (Johnston *et al.*, 2005). L'interféron de type 1 (IFN α et IFN β) est une cytokine sécrétée par les cellules de l'immunité innée suite à une infection virale. Le mécanisme expliquant la stricte barrière d'espèce du MYXV n'est pas encore décrit avec précision notamment celui régulant l'infection du lapin européen. Il a cependant été démontré que cette barrière existe au niveau de certaines cellules isolées en culture (Wang *et al.*, 2004).

En effet, après avoir pénétré dans des fibroblastes embryonnaires de souris

in vitro, le MYXV induit un signal toujours inconnu qui active les deux protéines kinases régulatrices du signal extracellulaire, Erk 1/2. En conséquent, ces dernières vont phosphoryler le facteur 3 de régulation de l'interféron, IRF3, qui en retour va induire la synthèse *de novo* d'IRF7. L'activation de ces deux facteurs entraîne la transcription, la synthèse et la sécrétion d'interférons de type 1 par la cellule infectée. Les IFN1 se lient aux récepteurs membranaires des cellules voisines et provoquent la phosphorylation du transducteur de signal et activateur de la transcription 1, STAT1. Ce facteur de transcription déclenche la transcription et la synthèse d'une kinase inconnue qui va phosphoryler le facteur de translation eucaryote 2 alpha (eIF2 α), responsable du blocage de la synthèse des protéines virales (Wang *et al.*, 2004).

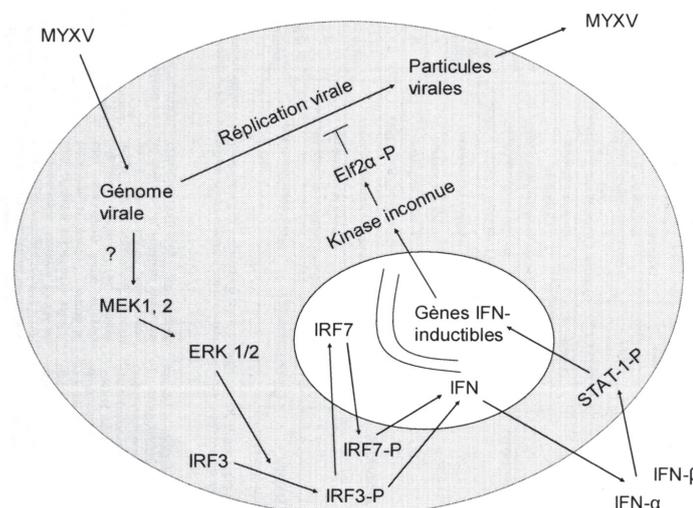
Ainsi, lorsque le MYXV infecte un organisme autre que le lapin européen, il déclencherait la cascade de signalisation Erk1/2-IFN-STAT1 (figure 1) conduisant à l'inhibition de la réplication virale. Cette cascade de phosphorylation constituerait donc un mécanisme permettant d'expliquer la barrière cellulaire innée qui empêche

la transmission du MYXV à d'autres espèces que le lapin européen. L'altération de cette cascade permet de supprimer cette barrière comme le démontre la mortalité de souris mutantes, déficientes en STAT1, après inoculation intracrâniale du MYXV (Wang *et al.*, 2004).

L'absence de permissivité des cellules normales humaines

Wang et collaborateur (2008) ont découvert que l'inhibition de la permissivité au MYXV dans des cultures de fibroblastes humains nécessite la présence conjointe d'IFN1, comme pour les fibroblastes de souris, mais également du facteur de nécrose tumorale (TNF). Ils ont également démontré que l'infection de macrophages humains en cultures primaires par le MYXV induisait la sécrétion de ces deux cytokines et que l'induction de ce phénomène était contrôlée par un ARN récepteur cytoplasmique appelé le gène 1 inducteur d'acide rétinolique (RIG1) qui activerait la protéine MAVS afin d'initier la cascade IRF3/IRF7 responsable de la sécrétion d'IFN1 et de TNF. Une autre étude a également prouvé que la synergie entre le TNF et l'IFN β permettait de bloquer la multiplication du MYXV

Figure 1 : Cascade de signalisation Erk1/2-IFN-STAT1 (d'après Vilcek, 2004)



L'inoculation du virus de la myxomatose (MYXV) à une culture de fibroblastes embryonnaires de souris induit la signalisation de ERK1/2, l'activation de IRF3 par phosphorylation et la synthèse de novo de IRF7. IRF3 et IRF7 activés migrent vers le noyau et entraînent la transcription des gènes d'IFN α et IFN β , suivis de leur synthèse et de leur sécrétion. Les IFN α et IFN β produits par les cellules qui ont été infectées par le MYXV se lient à leurs récepteurs situés sur les autres cellules de la culture, ce qui provoque l'activation de STAT1 et la synthèse de protéines qui rendent les cellules résistantes à l'infection du MYXV. Le blocage cellulaire de la réplication virale est corrélé avec la phosphorylation du facteur de translation eIF2 α , qui est responsable de l'inhibition de la synthèse des protéines virales.

Tableau II : corrélation entre le niveau d'Akt phosphorylée dans différentes lignées de cellules tumorales humaines et leur tolérance à l'infection par le virus de la myxomatose (MYXV) sauvage et délété de la protéine virale MT5, d'après Wang et collaborateurs (2006)

	Lignée cellulaire	Origine cellulaire	Akt endogène	[Phospho-Akt] endogène	Phospho-Akt		Multiplication	
					MYXV sauvage	MYXV délétée MT5	MYXV sauvage	MYXV délétée MT5
Contrôle	RK13	rein (lapin)	+	haute	+	+	O	O
	BGMK	rein (primate)	+	haute	+	+	O	O
	HEK293	rein (humain)	+	haute	+	+	O	O
Type I	HOS	ostéosarcome	+	haute	+	+	O	O
	Caki1	cancer du rein	+	haute	+	+	O	O
	PC3	cancer de la prostate	+	haute	+	+	O	O
Type II	HCT116	cancer du colon	+	basse	+	-	O	N
	7860	cancer du rein	+	basse	+	-	O	N
	ACHN	cancer du rein	+	basse	+	-	O	N
	U373	gliome	+	basse	+	-	O	N
	SKOV3	cancer des ovaires	+	basse	+	-	O	N
Type III	MCF7	cancer du sein	+	nulle	-	-	N	N
	COLO205	cancer du colon	+	nulle	-	-	N	N
	MD-AMB435	cancer du sein	+	nulle	-	-	N	N
	SKMEL5	mélanome	+	nulle	-	-	N	N

+ ou - : niveau endogène de protéine Akt phosphorylée ou phospho-Akt détectable (+) ou non détectable (-) par d'immunoblotting

O ou N : multiplication virale possible (O) ou non (N) dans les cellules considérées

dans plusieurs souches de fibroblastes humains (Bartee *et al.*, 2009). Enfin, Bartee et McFadden (2009) ont montré qu'un grand nombre de lignées cellulaires tumorales humaines avaient perdu cette capacité d'induire cette action synergique entre le TNF et l'IFN β .

L'absence de permissivité du virus envers les cellules normales est aussi influencée par la présence d'une protéine virale nommée M062. En effet, les lapins européens (*Oryctolagus*

cuniculus) infectés expérimentalement par des souches virales délétées pour la séquence codant cette protéine ne développent aucun signe clinique. La plupart des cellules normales humaines et de lapins sont résistantes à l'infection de ces mêmes virus mutants. Il semblerait que cette protéine s'associe avec une autre protéine virale, M063, pour former un complexe protéique. Lors de l'infection, ce complexe se lie à la protéine cellulaire 9 contenant le domaine motif α stérique (SAMD9), inhibe cette dernière et rend la cellule tolérante à l'infec-

tion. Ce résultat prouve que SAMD9 jouerait le rôle d'un facteur antiviral inné. Les protéines M062 et M063 doivent être présentes ensemble dans les cellules de lapin pour antagoniser SAMD9 alors que M062 peut réaliser cette action seule dans les cellules humaines (Liu *et al.*, 2011).

En dépit d'un spectre d'hôte *in vivo* limité aux léporidés le MYXV est aussi capable d'infecter *in vitro* certaines populations cellulaires d'autres espèces comme les cellules rénales

de singe vert (BGMK) ou les cellules rénales embryonnaires humaines (HEK293). Il semblerait que la concentration endogène élevée de ces cellules en Akt phosphorylée jouer un rôle dans cette permissivité (Wang *et al.*, 2006). Ces lignées cellulaires sont d'ailleurs utilisées par plusieurs équipes de recherche comme cellules de contrôle du tropisme des différentes souches du MYXV envers les cellules cancéreuses testées (tableau II).

Rôle central de la protéine virale MT5

Bien que le tropisme du MYXV pour les cellules du lapin puisse être expliqué par la spécificité des interférons de type 1 et du TNF, son tropisme pour une lignée de lymphocytes T CD4+ de lapin, appelée RL5, et pour les cellules tumorales est basé sur une interaction moléculaire différente faisant intervenir la protéine virale MT5 (Sypula *et al.*, 2004).

Lorsque des lapins sont infectés par des souches virales délétées pour la séquence codant pour la protéine MT5, la myxomatose clinique observée après inoculation est très atténuée, l'infection ne dépassant pas le stade des myxomes primaires au site d'inoculation (Mossman *et al.*, 1996). De même, lorsque des cellules de la lignée RL5 sont infectées par ces souches délétées pour MT5, les cellules entrent rapidement en apoptose avec une sévère inhibition de la synthèse tant des protéines virales que cellulaires (Mossman *et al.*, 1996). Ces observations montrent que MT5 est un facteur de virulence majeur du MYXV en empêchant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 et donc l'entrée en apoptose, induite naturellement comme mécanisme de défense cellulaire contre l'infection virale (Everett et McFadden., 2002). Le tropisme du MYXV pour les cellules de la lignée RL5 est donc lié à une dérégulation du cycle cellulaire par MT5. En bloquant l'apoptose, le MYXV peut se multiplier activement dans les cellules-hôtes.

Sypula et collaborateurs (2004) ont démontré pour la première fois que le MYXV pouvait infecter et se multiplier dans une majorité (15/21) des lignées de cellules cancéreuses humaines. Cette tolérance était maintenue pour les souches délétées dans les gènes codant pour les protéines MT2

et M11L mais disparaissait pour les virus délétés pour le gène codant pour MT5. À l'inverse, certaines lignées de cellules tumorales humaines se montraient non tolérantes à l'infection par des souches sauvages ou mutantes du MYXV.

La voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR

La transformation tumorale induit plusieurs dysfonctionnements cellulaires qui rendent les cellules malades tolérantes au MYXV. Certaines modifications touchent notamment les voies de transduction du signal et sont causées par la mutation de certains gènes codant pour des protéines intervenant dans ces mêmes voies. Parmi ces voies, la cascade phosphatidylinositol 3-kinase (PI3k)/ kinase Akt est une des plus importantes (Faivre *et al.*, 2006).

Une fois activée, Akt stimule la prolifération, la croissance, la survie cellulaire ainsi que d'autres processus qui amplifient le développement tumoral par phosphorylation de protéines intracellulaires comme la protéine mTOR (*mammalian target of rapamycin*). Cette protéine est une kinase agissant en aval de l'activation de l'Akt (Faivre *et al.*, 2006). Ainsi, la dérégulation de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR amplifie considérablement la réponse cellulaire, contribuant alors à renforcer le processus oncogénique qui l'a engendrée.

Classement des cellules cancéreuses humaines selon leur tolérance à l'infection par le virus de la myxomatose

Les cellules cancéreuses humaines peuvent être réparties sur base de leur sensibilité ou non à une infection par le MYXV. Ce classement se base sur la concentration intracellulaire en Akt phosphorylée ou phospho-Akt (Wang *et al.*, 2006). Trois catégories ont été déterminées et désignées comme type 1, 2 ou 3 (tableau II) sur base de leur capacité à supporter l'infection par une souche de MYXV sauvage ou délétée pour la protéine MT5 :

les lignées cellulaires tumorales humaines de type 1 présentent une concentration endogène élevée en phospho-Akt (rapport des concentrations en phospho-Akt / Akt total supérieur à 0,3). Ces cellules sont uniformément tolérantes au MYXV ;

les lignées cellulaires de type 2 possèdent une concentration faible en phospho-Akt (rapport des concentrations en phospho-Akt / Akt total compris entre 0,1 et 0,3) et ne sont sensibles qu'à l'infection par une souche virale produisant la protéine MT5. L'activation d'Akt par MT5 constitue une condition essentielle pour permettre la multiplication du MYXV dans ces cellules ;

les lignées cellulaires de type 3 ne contiennent pas de phospho-Akt (rapport des concentrations en phospho-Akt / Akt total inférieur à 0,1) endogène et sont uniformément non tolérantes au MYXV.

La capacité du MYXV de se multiplier dans les cellules de type 1 et 2 correspond aux connaissances actuelles sur les interactions MT5/Akt. Par contre, les raisons pour lesquelles le MYXV est incapable d'initier l'activation d'Akt après l'infection de cellules de type 3 sont encore inconnues. L'ajout de phospho-Akt dans une culture de cellules de ce même type rend ces dernières sensibles à une infection par le MYXV ce qui suggère que le blocage de l'infection pourrait être dû à l'incapacité de MT5 à se lier et activer Akt (Wang *et al.*, 2006). Il semblerait que, contrairement aux cellules de type 1 dont l'Akt est en conformation « complètement phosphorylée », les cellules de types 3 possèdent une Akt en conformation « non phosphorylée ». Cette conformation est peut-être liée à une surexpression ou à une activité excessive de phosphatases responsables de la déphosphorylation comme la protéine phosphatase 2A (PP2A) (Werden et McFadden., 2010). Ce classement des cellules tumorales permet de prévoir les utilisations cliniques potentielles du MYXV en fonction de la nature des différents cancers. Il apparaît aussi que la manipulation pharmacologique d'Akt permettrait d'augmenter la capacité oncolytique de ce virus et d'étendre son tropisme aux cellules de type 3.

L'interaction entre MT5 et Akt

L'oncogenèse se traduit par une concentration intracellulaire en Akt anormalement élevée ce qui a pour conséquence de sensibiliser les cellules cancéreuses à l'infection par le MYXV. Compte tenu de son rôle central dans la régulation de la signalisation cellulaire, de nombreux

virus comme le virus d'Epstein-Barr, les polyomavirus, les virus de l'hépatite A et B ont développé divers mécanismes qui leur permettent de déréguler la voie de signalisation de l'Akt afin de maintenir un environnement cellulaire favorable à la réplication virale. Dans ce cadre, la protéine MT5 agit en augmentant le niveau intracellulaire d'Akt phosphorylée (Werden et McFadden., 2008). Après pénétration du MYXV dans une cellule cancéreuse, MT5 se fixe à l'Akt. Cette liaison entraîne la phosphorylation et l'activation de cette protéine, qui dès lors bloque l'entrée en apoptose de la cellule infectée (Werden et McFadden., 2010). En conséquence, le MYXV peut se multiplier activement puis infecter d'autres cellules après lyse de la cellule-hôte. Ce processus s'observe en culture cellulaire par la formation de zones de lyse au sein des tapis cellulaires. Cette interaction entre MT5 et Akt est donc indispensable à la tolérance de l'infection par les cellules cibles. À l'inverse, le niveau endogène en Akt phosphorylée des cellules non cancéreuses n'est pas suffisamment élevé pour que le MYXV puisse y bloquer l'apoptose, ce qui constitue une protection supplémentaire des cellules humaines saines à l'infection par le MYXV.

Les agents thérapeutiques complémentaires

Des les premiers essais cliniques, l'oncolyse produite par l'utilisation du MYXV seule est apparue rapidement insuffisante, notamment lors des tests sur des souris immunocompétentes (Lun *et al.*, 2010). En effet, la réponse du système immunitaire à l'infection du MYXV implique la production d'IFN de type 1 qui inhibe la multiplication du virus (Lun *et al.*, 2010). Pour remédier à ce problème, une action combinée du MYXV avec des agents thérapeutiques complémentaires tels que la rapamycine a été proposée (Lun *et al.*, 2007). L'efficacité réelle de cette association à savoir sa capacité à amplifier considérablement le potentiel oncolytique du MYXV a ensuite été démontrée (Stanford *et al.*, 2007a).

La rapamycine

La rapamycine est un macrolide aux propriétés antifongiques et antibiotiques, utilisée en clinique comme médicament immunosuppresseur. L'étude de ses activités au niveau moléculaire a conduit à la découverte du rôle fondamental d'une protéine kinase dans la prolifération cel-

lulaire, la protéine (*mammalian target of rapamycin*) mTOR (Stanford *et al.*, 2007a). Le mécanisme d'action de la rapamycine est lié à l'inhibition de la protéine mTOR qui favorise l'infection des cellules par le MYXV de trois manières. Premièrement, la rapamycine possède un effet antiprolifératif sur de nombreux types cellulaires qui explique ses effets immunosuppresseurs ainsi que son activité antitumorale *in vitro* et *in vivo* (Lun *et al.*, 2007). Deuxièmement, l'activation d'Akt tend à augmenter le niveau de phospho-Akt ce qui augmente en corolaire la réceptivité cellulaire à une infection par le MYXV ainsi que l'oncolyse tissulaire (O'Reilly *et al.*, 2006). Troisièmement, la stimulation des cellules néoplasiques par les IFN de type 1 est empêchée, ce qui augmente les possibilités de multiplication du MYXV au sein du tissu (Lun *et al.*, 2010).

In vitro, les effets de la rapamycine n'augmentent pas la réplication virale dans les cellules tumorales de type 1, améliorent la réplication et la dissémination des souches sauvages et déléetées en MT5 dans les cellules de type 2 mais ne permet pas d'induire une multiplication dans les cellules de type 3 (Stanford *et al.*, 2007a).

Cette incapacité à induire une lyse des cellules tumorales de type 3 peut être levée par une double administration de rapamycine et d'acide okadaïque, un inhibiteur de la phosphatase PP2A. Cette observation soulève l'hypothèse d'une surexpression ou d'une activité excessive de cette phosphatase dans les tissus de type 3, cette phosphatase étant capable d'annuler l'activation d'Akt par la protéine MT5 en la déphosphorylant (Werden et McFadden, 2010).

Lors d'essais cliniques sur des cellules tumorales tolérantes, la combinaison entre la rapamycine et le MYXV accentua la capacité oncolytique du virus *in vitro* et *in vivo* (Lun *et al.*, 2007).

Les autres agents complémentaires

La « *convection-enhanced delivery* » (CED) est une technique d'infusion locale qui permet d'atteindre directement le système nerveux central (SNC) en contournant la barrière hémato-méningée et en limitant les effets systémiques. Adaptée au MYXV, cette technique optimise sa concentration et sa biodistribution au

sein de tumeurs touchant le SNC tels que les gliomes. L'infusion peut être constituée soit de MYXV libres (Lun *et al.*, 2010), soit de cellules infectées par le virus (Josiah *et al.*, 2010). Dans ce deuxième cas, les cellules utilisées sont des cellules souches dérivées du tissu adipeux (ADSCs) qui sont tolérantes à l'infection du MYXV, pour des raisons encore inconnues. Après infection par le MYXV, ces ADSCs sont capables de migrer spécifiquement vers les cellules tumorales et de se comporter comme structures transporteuses qui amènent le MYXV directement dans le tissu cancéreux (Josiah *et al.*, 2010).

La gemcitabine est un médicament utilisé dans les chimiothérapies contre les cancers et appartient au groupe des anti-métabolites. Woo et collaborateurs (2008) ont montré que les cellules cancéreuses sensibles à la gemcitabine ne l'étaient pas pour le MYXV et inversement. Des voies pro-apoptotiques encore inconnues permettraient d'expliquer cette différence de sensibilité.

La collagénase et la relaxine sont des protéines qui sont capables de dégrader la matrice extracellulaire. Elles sont utilisées lors de la synthèse *de novo* de fibres de collagène par les tumeurs, en réponse à une virothérapie oncolytique ce qui empêche la dissémination du virus dans le tissu cancéreux (Stanford *et al.*, 2008).

L'acide okadaïque est un inhibiteur spécifique de la phosphatase PP2A qui rend les cellules de type 3 tolérantes à l'infection en évitant que la majorité des protéines Akt ne restent bloquées en conformation « non phosphorylée ». La combinaison de cet acide avec la rapamycine augmente significativement la réplication du MYXV dans le troisième type cellulaire (Werden et McFadden, 2010).

Les essais cliniques

Dès le départ, les essais cliniques d'utilisation du MYXV comme agent oncolytique ont ciblé diverses tumeurs malignes humaines extrêmement agressives et ne répondant pas aux traitements connus. Sur base des excellents résultats obtenus sur différentes lignées de cellules cancéreuses humaines *in vitro*, le MYXV fut d'abord utilisé seul (Lun *et al.*, 2005) puis en combinaison avec des agents

thérapeutiques complémentaires (Lun *et al.*, 2007). *In vivo*, l'utilisation oncolytique du MYXV a été testée sur des modèles animaux de souris immunodéprimées ou immunocompétentes ayant subi une greffe ou une injection de différents types de cellules cancéreuses. La combinaison du MYXV avec des agents thérapeutiques complémentaires s'est avérée très efficace sur les souris immunodéprimées (Lun *et al.*, 2007) et obligatoire sur les souris immunocompétentes (Lun *et al.*, 2010).

Les essais précliniques (*in vitro*)

Les premières études (Lun *et al.*, 2005) ont démontré que la majorité des lignées cellulaires de gliome humain testées étaient tolérantes à une infection par le MYXV et que ces cellules cancéreuses étaient lysées lors du cycle de multiplication viral. Par la suite, la réceptivité de lignées cellulaires de médulloblastome humain à une infection létale par le MYXV a été confirmée, la combinaison de l'infection par le MYXV avec un traitement par la rapamycine amplifiait même fortement l'oncolyse induite (Lun *et al.*, 2007).

Plus récemment l'infection et la lyse de quatre lignées cellulaires de tumeurs rhabdoïdes (Wu *et al.*, 2008) puis de six lignées cellulaires d'adénocarcinome pancréatique humain ont été démontrées (Woo *et al.*, 2008). Pour les adénocarcinomes pancréatiques, les taux d'oncolyse variaient de 39 % à 90 % pour les lignées les plus résistantes ou les plus sensibles respectivement (Woo *et al.*, 2008).

Afin d'améliorer les résultats, des essais de traitement par la rapamycine conjointement avec une infection par le MYXV ont permis d'augmenter les effets oncolytiques en comparaison à la seule infection par le MYXV (Lun *et al.*, 2010) dans plusieurs lignées de gliome humain.

L'utilisation d'une technique d'infusion locale au moyen de cellules souches dérivées du tissu adipeux infectées par le MYXV a permis une augmentation notable de l'oncolyse induite expérimentalement dans deux lignées cellulaires de glioblastome multiforme humain avec un pourcentage de cellules infectées passant de 15 à 45 % (Josiah *et al.*, 2010).

Dernièrement, Wennier et collaborateurs (2012) ont prouvé que le MYXV était capable de se répliquer dans une large gamme de cellules tumorales pancréatiques et que l'oncolyse était augmentée lorsque le virus était associé à la gemcitabine.

Les essais cliniques (*in vivo*)

Les premiers essais *in vivo* ont été effectués sur des souris immunodéprimées ayant subi une xéno greffes de tumeurs de gliomes humains. Après inoculation intracérébrale par le MYXV, une diminution importante de la taille des tumeurs et une augmentation du temps de survie des souris ont été observées (Lun *et al.*, 2005). Malheureusement l'oncolyse n'est observée qu'au sein des tumeurs directement inoculées mais pas dans les tumeurs contralatérales non inoculées (Lun *et al.*, 2005).

Les effets positifs d'amélioration de l'oncolyse observés *in vitro* par traitement conjoint à la rapamycine ont été confirmés dans un modèle animal *in vivo* de souris immunodéprimées ayant reçu une xéno greffe de médulloblastome humain. Les pourcentages de survie à 100 jours post-implantation tumorale ont atteint 80 % chez les souris traitées par la combinaison sans présence de métastases contre 50 % et présence conjointe de métastases chez celles traitées avec le MYXV uniquement (Lun *et al.*, 2007).

L'efficacité et l'innocuité de l'oncolyse induite par le MYXV ont été confirmées dans un modèle animal de souris immunocompétentes inoculées par voie intraveineuse avec des cellules du mélanome de la souris puis traitées par la même voie par inoculation du MYXV. Le MYXV n'a pas pu être isolé des organes sains alors que le nombre de métastases pulmonaires a été réduit de 120 à 40 par souris ; les effets positifs d'un traitement conjoint MYXV/rapamycine étant également confirmés (Stanford *et al.*, 2008).

Lorsque le MYXV est utilisé seul par injection intra-tumorale dans un modèle de souris immunocompétentes ayant subi des xéno greffes de tumeurs de gliomes humains, la capacité oncolytique diminue très fortement, toutes les souris testées mourant 20 jours après l'implantation de la tumeur. Chez les souris traitées par une mé-

thode d'infusion locale au moyen de cellules souches dérivées du tissu adipeux et infectées par le MYXV la durée de survie augmente jusqu'à 30 jours. Enfin la combinaison de cette méthode avec un traitement à la rapamycine permet d'obtenir un temps de survie de plus de 45 jours chez 50 % des animaux testés (Lun *et al.*, 2010).

La méthode d'infusion locale au moyen de cellules souches dérivées du tissu adipeux et infectées par le MYXV a également été testée dans un modèle expérimental de souris inoculées avec des cellules de glioblastome multiforme. L'effet oncolytique observé est fortement accru, le temps de survie post greffe dépassant les 120 jours alors que la moyenne de survie était de 19,5 jours chez les animaux témoins (Josiah *et al.*, 2010).

Récemment, l'efficacité du MYXV a été évaluée dans un modèle expérimental de cancer pancréatique disséminé. Le MYXV est globalement plus efficace que l'administration de gemcitabine seule et permet d'atteindre des taux de survie de 60 % de survie à long-terme alors que ces taux atteignent même 100 % lors d'administration séquentielle du MYXV suivie de celle de gemcitabine (Wennier *et al.*, 2012).

L'utilisation *ex vivo* de la virothérapie oncolytique

Les hémopathies malignes incluent la leucémie, le lymphome, le myélome multiple ainsi que le syndrome myélodysplasique. Communément, ce type de cancer se traite en premier lieu par chimio- ou radiothérapie mais les rechutes sont fréquentes. Dans ce cas, des transplantations de cellules souches hématopoïétiques contenues dans la moelle osseuse sont pratiquées par autogreffes. Malheureusement, ces autogreffes sont souvent contaminées par des cellules cancéreuses et nécessitent des manipulations *ex vivo* destinées à les purifier. L'efficacité de ces manipulations est limitée et elles se révèlent souvent inefficaces par un manque de spécificité d'action sur les cellules malignes et une action délétère sur les cellules souches normales. L'utilisation *ex vivo* de la virothérapie oncolytique pour épurer ces autogreffes représenterait une solution à ce problème (Bais *et al.*, 2012).

Tableau III : liste non exhaustive de traitements théoriques à base du virus de la myxomatose dépendant du niveau de concentration d'Akt phosphorylée et de la localisation des cancers humains

Type de néoplasme	Concentration en phospho-Akt	Localisation de la tumeur	Traitement théorique		Voie d'administration
I	élevée	superficielle SNC	MYXV (1)		IT
			MYXV-CED (2)		IC
II	basse	superficielle SNC	MYXV + rapamycine (3)		MYXV : IT rapamycine : IP
			MYXV-CED + rapamycine (4)		MYXV-CED : IC rapamycine : IP
III	nulle	superficielle SNC	MYXV + gemcitabine (5)	MYXV + acide okadaïque + rapamycine (6)	MYXV : IT gemcitabine : IP acide okadaïque : IT
			MYXV-CED + gemcitabine (2, 5)	MYXV-CED + acide okadaïque + rapamycine (4, 6)	MYXV-CED : IC gemcitabine : IP acide okadaïque : IT rapamycine : IP
Hématopathie maligne	toutes	toutes	première intension	chimiothérapie/radiothérapie	IV
			seconde intension	autogreffes purifiées par le MYXV (8)	<i>ex vivo</i>

IT : intratumorale, IC : intracérébrale, IV : intraveineuse, IP : intrapéritonéale, MYXV : virus de la myxomatose, CED : *Convection-Enhanced Delivery*, SNC : système nerveux central

D'après (1) Stanford *et al.*, 2008, (2) Josiah *et al.*, 2010, (3) Lun *et al.*, 2007, (4) Lun *et al.*, 2010, (5) Wennier *et al.*, 2012, (6) Werden et McFadden, 2010, (7) Rahman *et al.*, 2010.

Une action sélective du MYXV sur les cellules cancéreuses sans atteintes des cellules normales d'une autogreffe (Kim *et al.*, 2009) a été démontrée et utilisée avec succès dans des autogreffes contaminées par des cellules cancéreuses provenant de patients atteints de leucémie myéloïde aigüe (Rahman *et al.*, 2010).

Conclusion

Un grand nombre d'essais d'utilisation du MYXV comme agent anticancéreux en modèles animaux sont encourageants et prouvent que ce virus aurait bien les capacités de cibler

et de lyser spécifiquement les cellules cancéreuses humaines *in situ* sans avoir recours à la manipulation génétique du génome viral et sans induire d'infections secondaires au niveau des tissus sains, même chez des souris immunodéprimées. Les résultats de ces différents essais sont résumés sous la forme d'un protocole thérapeutique théorique dans le tableau III.

À ce jour, aucun essai clinique n'a encore été effectué sur des patients humains permettant de confirmer ou non les résultats obtenus en modèles animaux et, à ce stade, l'utilisation du

virus de la myxomatose dans un cadre de virothérapie oncolytique est toujours purement spéculatif.

ONCOLYTIC VIROTHERAPY WITH MYXOMA VIRUS

SUMMARY: The myxoma virus (MYXV) is a poxvirus that causes myxomatosis in European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). The MYXV is non-pathogenic for the others vertebrate species, including the man. The MYXV has also an unexpected tropism for human cancer cells *in vitro* and an oncolytic potential *in vivo*. The permissiveness of these cells for the MYXV is intimately linked to the basal level of endogenous phosphorylated Akt. This enzyme is a serine/threonine protein kinase that plays a key role in multiple cellular processes and belongs to the PI3k/Akt/mTOR signaling pathway, which is amplified by the oncogenesis. The viral ankyrin-repeat protein, M T5, interacts with Akt and modulates the tropism of MYXV for human tumour cells. A regulator of cell growth and metabolism downstream of Akt, mTOR, is specifically inhibited by rapamycin. Thus, the use of rapamycin in combination with MYXV enhances the level of phosphorylated Akt, and consequently, increases its oncolytic capacity. A better pharmacological control of Akt signaling pathway or a genetic modification of its genome is a key step to create one of the new treatments of human's cancers.

BIBLIOGRAPHIE

- BAIS S., BARTEE E., RAHMAN M.M., MCFADDEN G., COGLE C.R. Oncolytic virotherapy for hematological malignancies. *Adv. Virol.*, 2012, doi:10.1155/2012/186512.
- BARTEE E., MOHAMED M.R., LOPEZ M.C., BAKER H.V., MCFADDEN G. The addition of tumor necrosis factor plus beta interferon induces a novel synergistic antiviral state against poxviruses in primary human fibroblasts. *J. Virol.*, 2009, **83**, 498-511.
- BARTEE E., MCFADDEN G. Human cancer cells have specifically lost the ability to induce the synergistic state caused by tumor necrosis factor plus interferon-beta. *Cytokine*, 2009, **47**, 199-205.
- BERTAGNOLI S., GELFI J., LE GALL G., BOILLETOT E., VAUTHEROT J.F., RASSCHAERT D., LAURENT S., PETIT F., BOUCRAUT-BARALON C., MILON A. Protection against myxomatosis and rabbit viral hemorrhagic disease with recombinant myxoma viruses expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. *J. Virol.*, 1996, **70**, 5061-5066.
- DOCK G. Influence of complicating diseases upon leukemia. *Am. J. Med. Sci.*, 1904, **127**, 563-592.
- EVERETT H., MCFADDEN G. Poxviruses and apoptosis: a time to die. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2002, **5**, 395-402.
- FAIVRE S., KROEMER G., RAYMOND E. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2006, **5**, 671-688.
- GILLET L., DEWALS B., FARNIR F., DE LEVAL L., VANDERPLASSCHEN A. Bovine Herpesvirus 4 induces apoptosis of human carcinoma cell lines *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.* 2005, **65**, 9463-9472
- JACKSON E.W., DORN C.R., SAITO J.K., McKERCHER D.G. Absence of serological evidence of myxoma virus infection in humans exposed during an outbreak of myxomatosis. *Nature*, 1966, **211**, 313-314.
- JOHNSTON J.B., MCFADDEN G. Technical knockout: understanding poxvirus pathogenesis by selectively deleting viral immunomodulatory genes. *Cell. Microbiol.*, 2004, **6**, 695-705.
- JOHNSTON J.B., NAZARIAN S.H., NATALE R., MCFADDEN G. Myxoma virus infection of primary human fibroblasts varies with cellular age and is regulated by host interferon responses. *Virology*, 2005, **332**, 235-248.
- JOSIAH D.T., ZHU D., DREHER F., OLSON J., MCFADDEN G., CALDAS H. Adipose-derived stem cells as therapeutic delivery vehicles of an oncolytic virus for glioblastoma. *Mol. Ther.*, 2010, **18**, 377-385.
- KIM M., MADLAMBAYAN G.J., RAHMAN M.M., SMALLWOOD S.E., MEACHAM A.M., HOSAKA K., SCOTT E.W., COGLE C.R., MCFADDEN G. MYXOMA VIRUS TARGETS PRIMARY HUMAN LEUKEMIC STEM and progenitor cells while sparing normal hematopoietic stem and progenitor cells. *Leukemia*, 2009, **23**, 2313-2317.
- LIU J., WENNIER S., ZHANG L., MCFADDEN G. M062 is a host range factor essential for myxoma virus pathogenesis and functions as an antagonist of host SAMD9 in human cells. *J. Virol.*, 2011, **85**, 3270-3282.
- LUN X.Q., YANG W., ALAIN T., SHI Z.Q., MUZIK H., BARRETT J.W., MCFADDEN G., BELL J., HAMILTON M.G., SENGER D.L., FORSYTH P.A. Myxoma virus is a novel oncolytic virus with significant antitumor activity against experimental human gliomas. *Cancer Res.*, 2005, **65**, 9982-9990.
- LUN X.Q., ZHOU H., ALAIN T., SUN B., WANG L., BARRETT J.W., STANFORD M.M., MCFADDEN G., BELL J., SENGER D.L., FORSYTH P.A. Targeting human medulloblastoma: oncolytic virotherapy with myxoma virus is enhanced by rapamycin. *Cancer Res.*, 2007, **67**, 8818-8827.
- LUN X.Q., ALAIN T., ZEMP F.J., ZHOU H., RAHMAN M.M., HAMILTON M.G., MCFADDEN G., BELL J., SENGER D.L., FORSYTH P.A. Myxoma virus virotherapy for glioma in immunocompetent animal models: optimizing administration routes and synergy with rapamycin. *Cancer Res.*, 2010, **70**, 598-608.
- MARLIER D., HERBOTS J., DETILLEUX J., LEMAIRE M., THIRY E., VINDEVOGEL H. Cross-sectional study of the association between pathological conditions and myxoma-virus seroprevalence in intensive rabbit farms in Europe. *Prev. Vet. Med.*, 2001, **48**, 55-64.
- MCFADDEN G. Poxvirus tropism. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2005, **3**, 201-213.
- MOSSMAN K., LEE S.F., BARRY M., BOSHKOV L., MCFADDEN G. Disruption of M-T5, a novel myxoma virus gene member of poxvirus host range superfamily, results in dramatic attenuation of myxomatosis in infected European rabbits. *J. Virol.*, 1996, **70**, 4394-4410.
- O'REILLY K.E., ROJO F., SHE Q.-B., SOLIT D., MILLS G.B., SMITH D., LANE H., HOFMANN F., HICKLIN D.J., LUDWIG D.L., BASELGA J., ROSEN N. mTOR inhibition induces upstream receptor Tyrosine Kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res.*, 2006, **66**, 1500-1508.

- RAHMAN M.M., MADLAMBAYAN G.J., COGLE C.R., MCFADDEN G. Oncolytic viral purging of leukemic hematopoietic stem and progenitor cells with Myxoma virus. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2010, **21**, 169-75.
- STANFORD M.M., BARRETT J.W., NAZARIAN S.H., WERDEN S., MCFADDEN G. Oncolytic virotherapy synergism with signaling inhibitors: rapamycin increases myxoma virus tropism for human tumor cells. *J. Virol.*, 2007a, **81**, 1251-1260.
- STANFORD M.M., WERDEN S.J., MCFADDEN G. Myxoma virus in the European rabbit: interactions between the virus and its susceptible host. *Vet. Res.*, 2007b, **38**, 299-318.
- STANFORD M.M., SHABAN M., BARRETT J.W., WERDEN S.J., GILBERT P.A., BONDY-DENOMY J., MACKENZIE L., GRAHAM K.C., CHAMBERS A.F., MCFADDEN G. Myxoma virus oncolysis of primary and metastatic B16F10 mouse tumors in vivo. *Mol. Ther.*, 2008, **16**, 52-59.
- SYPUŁA J., WANG F., MA Y., BELL J., MCFADDEN G. Myxoma virus tropism in human tumor cells. *Gene Ther. Mol. Biol.*, 2004, **8**, 103-114.
- VILCEK J. Why are rabbits uniquely sensitive to myxoma virus? Cherchez l'interferon! *Nat. Immunol.*, 2004, **5**, 1205-1206.
- WANG F., MA Y., BARRETT J.W., GAO X., LOH J., BARTON E., VIRGIN H.W., MCFADDEN G. Disruption of Erk-dependent type I interferon induction breaks the myxoma virus species barrier. *Nat. Immunol.*, 2004, **5**, 1266 - 1274.
- WANG G., BARRETT J.W., STANFORD M., WERDEN S.J., JOHNSTON J.B., GAO X., SUN M., CHENG J.Q., MCFADDEN G. Infection of human cancer cells with myxoma virus requires Akt activation via interaction with a viral ankyrin-repeat host range factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, **103**, 4640-4645.
- WANG F., GAO X., BARRETT J.W., SHAO Q., BARTEE E., MOHAMED M.R., RAHMAN M., WERDEN S., IRVINE T., CAO J., DEKABAN G.A., MCFADDEN G. RIG-I mediates the co-induction of tumor necrosis factor and type I interferon elicited by myxoma virus in primary human macrophages. *PLoS Pathog.*, 2008, **4**, e1000099.
- WENNIER S.T., LIU J., LI S., RAHMAN M.M., MONA M., MCFADDEN G. MYXOMA VIRUS SENSITIZES CANCER CELLS to gemcitabine and is an effective oncolytic virotherapeutic in models of disseminated pancreatic cancer. *Mol. Ther.*, 2012, **20**, 759-768.
- WERDEN S.J., MCFADDEN G. The role of cell signaling in poxvirus tropism: the case of the M-T5 host range protein of myxoma virus. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, **1784**, 28-37.
- WERDEN S.J., MCFADDEN G. Pharmacological manipulation of the akt signaling pathway regulates myxoma virus replication and tropism in human cancer cells. *J. Virol.*, 2010, **84**, 3287-3302.
- WOO Y., KELLY K.J., STANFORD M.M., GALANIS C., CHUN Y.S., FONG Y., MCFADDEN G. Myxoma virus is oncolytic for human pancreatic adenocarcinoma cells. *Ann. Surg. Oncol.*, 2008, **15**, 2329-2335.
- WU Y., LUN X.Q., ZHOU H., WANG L., BEICHEN S., BELL J.C., BARRETT J.W., MCFADDEN G., BIEGEL J.A., SENGER D.L., FORSYTH P.A. Oncolytic efficacy of recombinant vesicular stomatitis virus and myxoma virus in experimental models of rhabdoid tumors. *Clin. Cancer Res.*, 2008, **14**, 1218-1227.