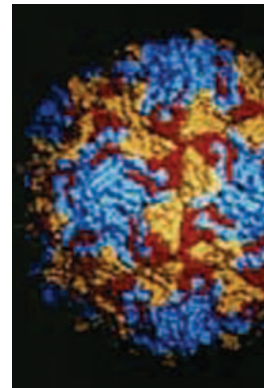


> Depuis quelques années, plusieurs études ont montré que certains virus peuvent détruire des cellules cancéreuses, tout en épargnant les cellules normales. Un des exemples récents de virus « oncolytique » est celui du réovirus de mammifères dont la réplication dans les cellules infectées est normalement bloquée par l'activation de la protéine kinase cellulaire PKR. En revanche, la transformation cellulaire par activation du proto-oncogène *Ras* inhibe la PKR, ce qui permet la réplication virale et entraîne la destruction des cellules infectées. Les études réalisées *in vivo* dans différents modèles murins de tumorigenèse ont révélé que l'infection locale par les réovirus entraîne la régression des tumeurs. De tels virus oncolytiques pourraient donc représenter une voie thérapeutique de certains cancers. <

Le réovirus de mammifères: un virus « orphelin » contre les cancers humains

Guy Lemay



Département de microbiologie et d'immunologie, Université de Montréal, CP 6128, succursale Centre-ville, Montréal, Québec, H3C 3J7 Canada. guy.lemay@umontreal.ca

réovirus illustre également les principes guidant le développement de l'utilisation de virus en tant qu'agents anticancéreux.

Les réovirus de mammifères

L'acronyme de réovirus (*respiratory enteric orphan virus*) a été proposé par Sabin en 1959 pour désigner un groupe de virus largement répandus mais ne pouvant être clairement associés à une pathologie (pour revue, voir [3, 4]). Ces virus ont été isolés chez des individus présentant des symptômes respiratoires ou entériques très modestes. Chez l'adulte, il est peu probable que les réovirus de mammifères soient pathogènes. L'inoculation intra-nasale de virus, réalisée dans les années 1960 chez des volontaires, a seulement provoqué l'apparition dans quelques cas de légers symptômes au niveau des voies aériennes supérieures [5]. En outre, plus de 70 % des adultes dans les pays industrialisés possèdent des anticorps contre les réovirus, ce qui suggère que l'exposition à ces virus n'entraîne que peu ou pas de conséquences pour la santé. Une association

Le premier exemple d'utilisation thérapeutique des virus est celui des vecteurs viraux en thérapie génique. Plus récemment, il a été proposé que des virus pourraient aussi être utilisés contre certains cancers [1,2]. Les interactions complexes entre un virus et sa cellule hôte déterminent si celle-ci est détruite ou non lors du cycle de réplication d'un virus donné. Étant donné les nombreuses voies de régulation cellulaire empruntées par les virus pour se répliquer, il n'est guère surprenant que le statut de cellule transformée s'accompagne de modifications - blocage ou facilitation - de la réplication virale. Dans le cas d'une facilitation, l'activité oncolytique du virus pourrait s'avérer une voie thérapeutique potentielle contre certains cancers. Parmi les virus proposés comme des agents « oncolytiques » éventuels, on trouve différentes formes manipulées génétiquement d'adénovirus, d'herpèsvirus et de rétrovirus ainsi que, plus récemment, le virus de la stomatite vésiculaire et le réovirus de mammifères. Bien que ce dernier n'ait été qu'assez récemment l'objet d'études en ce sens, les progrès visant à son utilisation éventuelle en clinique ont été rapides. L'exemple du

entre la présence de ces virus et l'atrésie biliaire chez l'enfant a toutefois été proposée, mais demeure controversée [6].

Les réovirus sont des virus sans enveloppe et possédant une double capsidie protéique. Leur pénétration dans les cellules s'effectue par endocytose suivie d'une digestion partielle de la capsidie externe par des enzymes lysosomiales (Figure 1). Cette élimination de certaines protéines de la capsidie externe permet la traversée de la membrane de l'endosome par le virus. Un autre mécanisme d'entrée du virus dans la cellule, sans doute prépondérant dans les conditions naturelles d'infection, repose sur la digestion protéolytique de la capsidie

externe par des enzymes présentes au sein du tractus intestinal, digestion qui permettrait une pénétration trans-membranaire directe du virus. Des résultats obtenus par notre équipe ont également révélé que la protéolyse de la capsidie externe peut démasquer une activité « mucinolytique » du virus, ce qui pourrait faciliter l'infection virale des surfaces épithéliales muqueuses recouvertes d'une épaisse couche de mucine [7].

Le génome du réovirus consiste en dix segments d'ARN bicaténaire transcrits par des enzymes virales au sein de la capsidie interne du virus, et codant pour onze protéines. La réplication du génome viral s'effectue par synthèse du brin négatif à partir du brin d'ARN positif, pour former un ARN bicaténaire. Le cycle répliatif des réovirus s'achève généralement par la lyse cellulaire, entraînant le relargage de particules virales.

In vitro, le spectre d'hôte des réovirus de mammifères semble très large. De multiples lignées cellulaires d'origine animale (humaine, simienne, murine, canine, etc.) permettent en effet la répliation virale [8]. L'origine tissulaire des cellules sensibles (fibroblastes, cellules épithéliales, neurones...) est également très large.

Cependant, il avait été suggéré, et ce voilà déjà plus de vingt ans, que les réovirus de mammifères se répliaient *in vitro* de manière préférentielle dans les cellules transformées [9, 10]. En dépit de l'intérêt de ces premières observations, ce n'est que récemment que cette propriété a été explorée de façon plus approfondie, notamment par le groupe de Patrick Lee (Calgary, Canada). *In vitro*, la répliation préférentielle des réovirus dans les cellules transformées semble dépendre d'une activation de voies de signalisation dépendantes de l'onco-

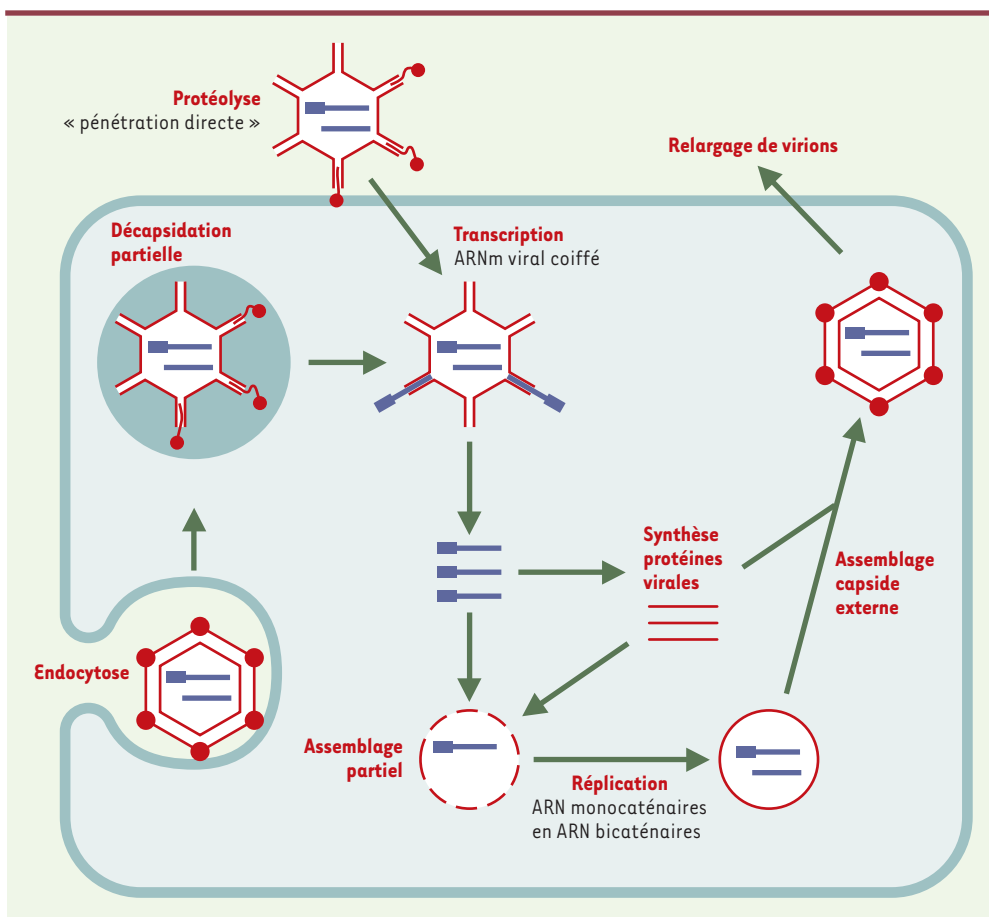


Figure 1. Cycle répliatif du réovirus. La pénétration du virus s'effectue par endocytose suivie d'une digestion partielle de la capsidie externe par des enzymes lysosomiales permettant la traversée de la membrane endosomiale par le virus. Une voie alterne consiste en une digestion protéolytique de la capsidie externe par des enzymes retrouvées au sein du tractus intestinal ; cela permettrait une pénétration transmembranaire directe de la particule intermédiaire ainsi produite. Le génome viral formé de dix segments d'ARN bicaténaire est transcrit par des enzymes virales présentes au sein de la capsidie interne du virus. L'ARN messager viral coiffé libéré dans le cytoplasme permet la synthèse des protéines virales, suivie de leur assemblage et de la reconnaissance d'une copie de chacun des ARN viraux afin de former une nouvelle particule (assemblage partiel). Le génome viral sera répliqué au sein de cette dernière par copie de la matrice d'ARN messager monocaténaire en ARN bicaténaire. La capsidie externe sera finalement ajoutée afin de produire des virions complets et infectieux qui seront relargués par lyse cellulaire.

gène *Ras* [11,12]. Le lien entre l'activation de *Ras* et la réplication virale se fait *via* un contrôle de la traduction par la protéine kinase cellulaire dépendante de l'ARN bicaténaire (PKR).

La protéine PKR : contrôle traductionnel et oncogène

La PKR est l'une des protéines induites par l'interféron (pour revue, voir [13]), et elle joue un rôle important dans l'activité antivirale de cette cytokine, y compris vis-à-vis des réovirus [14, 15]. L'activation de la PKR est dépendante de la formation d'homodimères actifs de l'enzyme grâce à sa liaison avec de l'ARN bicaténaire, ou à des structures bicaténaires formées par le repliement de molécules d'ARN monocaténaires (Figure 2). La PKR activée peut alors s'autophosphoryler, par réaction intermoléculaire au sein du dimère, puis phosphoryler divers substrats cellulaires. Le plus important est sans doute le facteur d'initiation de la traduction eIF-2 α dont l'activité est alors inhibée, ce qui bloque la syn-

thèse protéique. Pour des raisons qui ne sont pas encore clarifiées, la traduction des ARN messagers viraux est souvent inhibée de façon préférentielle à la suite de cette phosphorylation de eIF-2 α . L'importance de la PKR dans le contrôle de la réplication virale est également mise en évidence par le fait que de multiples virus non apparentés ont acquis des mécanismes s'opposant à l'effet de cette kinase [16].

Outre son activité antivirale, la PKR pourrait aussi agir en tant qu'anti-oncogène. Il a en effet été démontré que son inhibition, par l'expression d'un mutant dominant négatif, entraîne la transformation de fibroblastes NIH-3T3 en culture, un même phénotype pouvant être obtenu par l'expression d'un mutant non phosphorylable de son substrat eIF-2 α .

Transformation cellulaire et infection par les réovirus

Les fibroblastes NIH-3T3 sont normalement résistants à l'infection par les réovirus. En effet, même si le virus a la capacité de pénétrer dans la cellule, la transcription des ARN viraux provoque la phosphorylation et l'activation de la PKR, bloquant ainsi la synthèse des protéines virales. En revanche, l'activation de la PKR est bloquée si les cellules sont transformées par l'expression de Harvey-*Ras*, une forme constitutivement active, liée au GTP, de la protéine *Ras* (Figure 3). Ce phénomène d'inhibition de la PKR par *Ras* était déjà connu, mais le mécanisme impliqué demeure encore obscur [17, 18]. Dans les cellules transformées et infectées par le réovirus, l'inhibition de la PKR est associée à une importante synthèse des protéines virales, entraînant la lyse des cel-

lules. Cette sensibilité des cellules à l'infection virale n'est pas due à la transformation cellulaire elle-même, mais à l'activation de la voie de signalisation de *Ras*. Les cellules transformées par certains autres oncogènes tels que *Myc* demeurent en effet résistantes ; elles deviennent en revanche sensibles si la voie *Ras* est activée de façon indirecte par stimulation du récepteur de l'EGF (*epidermal growth factor*) ou par l'expression de l'oncogène *Erb-B*, une forme tronquée et constitutivement active de ce récepteur [11]. Compte tenu de la complexité des voies de signalisation intracellulaire reliées à *Ras* [19], on peut supposer que d'autres facteurs impliqués dans cette voie pourraient aussi affecter la réplication virale.

L'effet *in vivo* de l'infection virale sur la croissance tumorale a ensuite été étudié dans différents modèles murins de tumorigénèse [20]. L'injection locale de réovirus entraîne la régression des tumeurs développées après transplantation, chez la souris NIH, de cellules NIH-T3 transformées. Des résultats semblables ont été obtenus avec des tumeurs développées à partir de cellules de lignées tumorales humaines implantées chez des souris immunodéficientes (souris *nude*).

Une limite possible à l'utilisation thérapeutique des réovirus pourrait être la réponse immunitaire de l'hôte, soit lors d'une infection primaire, soit en cas d'immunité préalable contre le virus, qui concerne une majorité de la

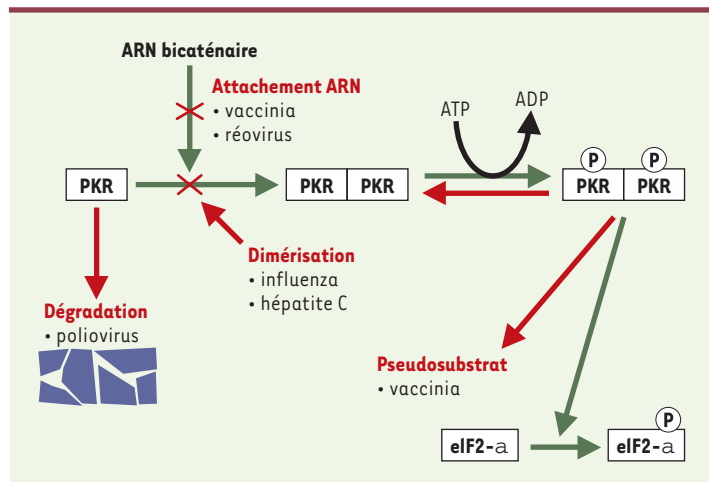


Figure 2. Mécanisme d'action de la PKR et contrôle par des facteurs viraux. L'attachement d'un activateur d'ARN bicaténaire à la PKR permet la formation du dimère actif de l'enzyme. L'autophosphorylation de la PKR augmente aussi son activité qui, finalement, entraîne la phosphorylation de substrats tels que eIF-2 α . La phosphorylation du facteur de traduction eIF-2 α bloque l'activité de celui-ci et inhibe la synthèse protéique. Certains facteurs viraux peuvent agir en dégradant la PKR *via* une activité protéolytique, en bloquant la dimérisation, en interférant avec l'attachement à l'ARN bicaténaire, ou en agissant à titre de pseudo-substrat, ce qui limite l'activité de la PKR sur eIF-2 α .

population humaine déjà exposée aux réovirus. Cependant, les études effectuées sur des souris syngéniques immuno-compétentes montrent que l'injection de virus dans des tumeurs développées à partir de fibroblastes transformés par *Ras* provoque la régression de ces tumeurs. Une régression tumorale est également observée si les souris ont été pré-immunisées contre le réovirus.

Des expériences d'immunolocalisation ont clairement établi que la régression tumorale est liée à la synthèse abondante de protéines virales au sein des cellules cancéreuses infectées, entraînant leur destruction. L'activation, directe ou indirecte (par exemple *via* l'activation de *Erb-B*) de *Ras* était observée dans plus de 60 % des tumeurs humaines. Cela permet d'envisager que de nombreux cancers puissent être sensibles à l'effet cytolytique des réovirus. Cette hypothèse est renforcée par les études réalisées chez la souris qui montrent que des tumeurs développées à partir de cellules de gliomes, de lymphomes, de cancers de l'ovaire, du sein, de la vessie, du côlon ou de la prostate, sont effectivement sensibles au virus [2, 20-24].

Si, jusqu'à présent, l'effet antitumoral des réovirus a été surtout examiné après injection locale au sein des tumeurs, des résultats récents montrent que ces virus sont également efficaces s'ils sont administrés par voie systémique, ce qui serait un atout important pour éliminer les métastases situées dans des sites anatomiques éloignés de la tumeur primaire [24, 25].

Il reste à établir si une thérapie reposant sur l'utilisation de réovirus répondrait à tous les critères de sécurité requis pour une utilisation en clinique humaine. L'utilisation de réovirus sous le nom de Reolysin® fait l'objet d'un premier essai clinique de phase I (<http://www.oncolyticsbiotech.com/>) dans lequel dix-huit patients ne répondant pas aux traitements anticancéreux classiques ont reçu, par injection intra-tumorale, des doses variables de virus. Aucun effet secondaire n'a été observé, confirmant le faible pouvoir pathogène du virus chez l'adulte. En outre, les résultats préliminaires montrent une diminution du volume tumoral chez plus de la moitié de ces patients.

Conclusions

Ces premiers résultats cliniques encourageants devront être confirmés ; des études de phase II sont d'ailleurs actuellement en cours. Il paraît également important de mieux comprendre les mécanismes de l'effet de la PKR sur la réplication virale ainsi que les mécanismes d'inhibition de la PKR par *Ras* ou par d'autres facteurs cellulaires. Des études portant sur l'effet du virus sur l'apoptose et le cycle cellulaire devraient aussi permettre de mieux comprendre les processus de mort cellulaire déclenchés par l'infection virale et, ainsi, contribuer à optimiser l'utilisation des réovirus en tant qu'agent oncolytique [26].

Les virus pourraient-ils devenir une composante essentielle de l'arsenal thérapeutique disponible pour le traitement de cancers? Si beaucoup de travail demeure nécessaire, il est probable que certains virus, notamment les réovirus, rejoindront éventuellement, et de façon complémentaire, les approches chirurgicale, pharmacologique et immunologique en oncologie humaine. ♦

SUMMARY

Mammalian reovirus: addition of an « orphan » virus to therapeutic agents against human cancers

Different viruses possess « tropism » that allow them to infect one or few specific cell types. In the last few years, the idea that some viruses could destroy cancer cells, while sparing normal cells, has been proposed. In parallel with the development of genetically engineered viruses, naturally oncolytic viruses are also considered in cancer therapy. Some viruses, such as mammalian reovirus, are interfered in their replication by the cellular protein kinase PKR. However, cell transformation by an activated *Ras* protooncogene can inhibit PKR. Mammalian reoviruses infect humans without an associated disease (« orphan » virus), suggesting a possible therapeutic application. It has, in fact, been shown that tumor regression through reovirus infection could be achieved in murine models. Studies are under progress to apply similar procedures in humans, since numerous human cancers harbor an activated *Ras*. ♦

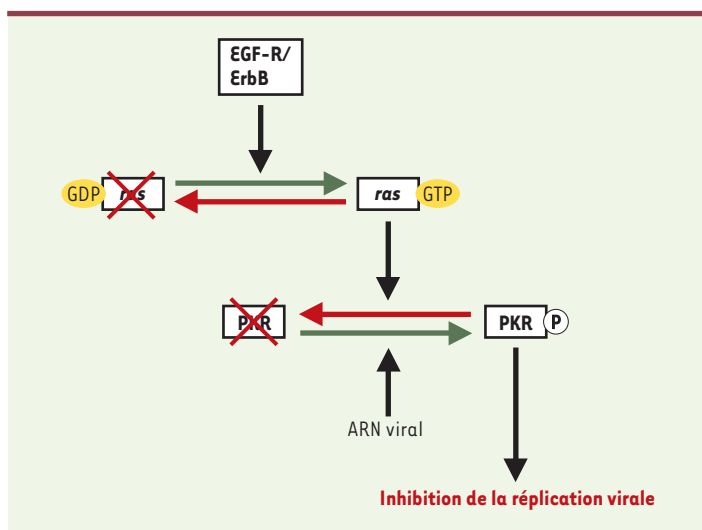


Figure 3. Effet de Ras sur la synthèse protéique. Cette figure résume quelques-unes des interactions fonctionnelles entre la voie de signalisation de *Ras* et le contrôle de la synthèse protéique *via* la PKR. Les flèches vertes indiquent un effet positif (activation) et les flèches rouges un effet négatif. Les flèches noires indiquent que la protéine ou l'ARN déplace l'équilibre positivement ou négativement. Les effets ne sont pas nécessairement directs mais peuvent demander la participation d'intermédiaires qui ne sont pas toujours connus.

RÉFÉRENCES

1. Ring CJ. Cytolytic viruses as potential anti-cancer agents. *J Gen Virol* 2002; 83: 491-502.
2. Norman KL, Farassati F, Lee PW. Oncolytic viruses and cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001; 12: 271-82.
3. Virgin HW, Tyler KL, Dermody TS. Reovirus. In: Nathanson N, ed. *Viral pathogenesis*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996 : 669-99.
4. Nibert ML, Schiff LA. Reoviruses and their replication. In : Knipe DM, Howley PM, eds. *Fundamental virology*, 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2001 : 793-842.
5. Rosen L, Evans HE, Spickard A. Reovirus infections in human volunteers. *Am J Hyg* 1963; 77: 29-37.
6. Organ EL, Rubin DH. Pathogenesis of reovirus gastrointestinal and hepatobiliary disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998; 233 : 67-83.
7. Bisailon M, Bernier L, Sénéchal S, Lemay G. A glycosyl hydrolase activity of mammalian reovirus $\sigma 1$ protein can contribute to viral infection through a mucus layer. *J Mol Biol* 1999; 286: 759-73.
8. 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 Biol* 1993; 71: 81-5.
9. Hashiro G, Loh PC, Yau JT. The preferential cytotoxicity of reovirus for certain transformed cell lines. *Arch Virol* 1977; 54: 307-15.
10. Duncan MR, Stanish SM, Cox DC. Differential sensitivity of normal and transformed human cells to reovirus infection. *J Virol* 1978; 28: 444-9.
11. Strong JE, Lee PWK. The v-*erbB* oncogene enhanced cellular susceptibility to reovirus infection. *J Virol* 1996; 70: 612-6.
12. 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.
13. Kaufman RJ. The double-stranded RNA-activated protein kinase PKR. In : Sonenberg N, Hershey JWB, Mathews MB, eds. *Translation control of gene expression*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000 : 503-27.
14. Samuel CE. Reoviruses and the interferon system. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998; 233 : 125-45.
15. Schiff LA. Reovirus capsid proteins $\sigma 3$ and $\mu 1$: interactions that influence viral entry, assembly, and translational control. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998; 233: 167-83.
16. Gale M, Katze MG. Molecular mechanisms of interferon resistance mediated by viral-directed inhibition of PKR, the interferon-induced protein kinase. *Pharmacol Ther* 1998; 78: 29-46.
17. Mundschauf LJ, Faller DV. Oncogenic Ras induces an inhibitor of double-stranded RNA-dependent eukaryotic initiation factor 2 α -kinase activation. *J Biol Chem* 1992; 267: 23092-8.
18. Mundschauf LJ, Faller DV. Endogenous inhibitors of the dsRNA-dependent eIF-2 α protein kinase PKR in normal and *ras*-transformed cells. *Biochimie* 1994; 76: 792-800.
19. Reuter CWM, Morgan MA, Bergmann L. Targeting the Ras signaling pathway: a rational mechanism-based treatment for hematologic malignancies. *Blood* 2000; 96: 1655-69.
20. Coffey MC, Strong JE, Forsyth PA, Lee PW. Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway. *Science* 1998; 282: 1332-4.
21. Wilcox ME, Yang WQ, Senger D, et al. Reovirus as an oncolytic agent against experimental human malignant gliomas. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 903-12.
22. Hirasawa K, Nishikawa SG, Norman KL, Alain T, Kossakowska A, Lee PW. Oncolytic reovirus against ovarian and colon cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 1696-701.
23. Norman KL, Coffey MC, Hirasawa K, et al. Reovirus oncolysis of human breast cancer. *Hum Gene Ther* 2002; 13: 641-52.
24. Alain T, Hirasawa K, Pon KJ, et al. Reovirus therapy of lymphoid malignancies. *Blood* 2002 (PMID 12393565).
25. Hirasawa K, Yoon CS, Nishikawa SG, Waisman DM, Lee PWK. Reovirus therapy of metastatic cancer models in immune-competent mice. *Annual Meeting of the American Association for Cancer Research* 2001. Résumé: http://aacr01.agora.com/planner/displayabstract.as?presentation_id=13225.
26. Oberhaus SM, Dermody TS, Tyler KL. Apoptosis and the cytopathic effects of reovirus. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998; 233 : 23-49.

TIRÉS À PART

G. Lemay