

# Du neuf dans le traitement des cancers du pancréas : les virus oncolytiques

## Oncolytic Virus for the Therapy of Pancreatic Adenocarcinoma

Pierre Cordelier

### Mots clés

- ◆ Cancer du pancréas
- ◆ Virus oncolytiques
- ◆ HSV-1

### Résumé

Comme dans de nombreux autres cancers, la progression de l'adénocarcinome canalaire du pancréas (PDAC) est associée à une série de changements dans les cellules cancéreuses afin de sécuriser leur propre croissance. Pourtant, ces mêmes changements rendent les cellules cancéreuses hautement sensibles à l'infection virale. Une stratégie prometteuse fondée sur la réplication virale à visée antitumorale a ses fondements dans l'infection de cellules tumorales par un virus à réplication conditionnelle conduisant à la destruction des cellules et la libération simultanée de particules qui peuvent se propager et infecter les cellules tumorales adjacentes, tout en épargnant les tissus sains. Dans la présente étude, nous avons utilisé Myb34.5, une deuxième génération de virus HSV-1 mutants à réplication conditionnelle dans lequel l'expression du gène ICP6 est défectueuse et l'expression du gène  $\gamma_134.5$  HSV-1 est régulée par le promoteur cellulaire B-myb. Nous avons constaté que B-myb est présent dans des modèles expérimentaux de PDAC et dans les tumeurs des patients, en comparaison avec des pancréas adjacents normaux. Myb34.5 réplique à haut niveau dans des lignées cellulaires humaines dérivées de PDAC et est associé à une mort cellulaire par apoptose. Dans des modèles expérimentaux de PDAC, les souris recevant des injections intratumorales de Myb34.5 demeurent en bonne santé et la progression tumorale est inhibée, avec des preuves de nécrose tumorale, d'hémorragie, de réplication virale et de mort des cellules cancéreuses par apoptose. La combinaison de la chimiothérapie de référence et du virus ciblé Myb34.5 conduit à un effet antitumoral très impressionnant qui est rarement atteint dans ce modèle expérimental, provoquant une plus grande réduction de la croissance tumorale que la chimiothérapie seule. Ces résultats prometteurs justifient une évaluation plus approfondie en essai clinique chez les patients atteints de cancer du pancréas pour lesquels aucun traitement efficace n'est disponible.

### Keywords

- ◆ Pancreatic cancer
- ◆ Oncolytic virus
- ◆ HSV-1

### Abstract

As many other cancers, pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) progression is associated with a series of hall-mark changes for cancer cells to secure their own growth success. Yet, these very changes render cancer cells highly sensitive to viral infection. A promising strategy may rely on and exploit viral replication for tumour destruction, whereby infection of tumour cells by a replication-conditional virus may lead to cell destruction and simultaneous release of progeny particles that can spread and infect adjacent tumour cells, while sparing healthy tissues. In the present study, we used Myb34.5, a second-generation replication-conditional HSV-1 mutant in which *ICP6* gene expression is defective and expression of the HSV-1  $\gamma_134.5$  gene is regulated by the cellular B-*myb* promoter. We found that B-*myb* is present in experimental PDAC and tumours, and is over expressed in patients' tumours, as compared to normal adjacent pancreas. Myb34.5 replicates to high level in human PDAC cell lines and is associated with cell death by apoptosis. In experimental models of PDAC, mice receiving intratumoral Myb34.5 injections appeared healthy and tumour progression was inhibited, with evidences of tumour necrosis, haemorrhage, viral replication and cancer cell death by apoptosis. Combining standard-of-care chemotherapy with Myb34.5 successfully led to a very impressive antitumoral effect that is rarely achieved in this experimental model, and resulted in a greater reduction in tumour growth than chemotherapy alone. These promising results warrant further evaluation in early phase clinical trial for patients diagnosed with PDAC for whom no effective treatment is available.

L'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC) est très résistant aux traitements classiques et demeure la quatrième cause de décès liés au cancer dans les pays occidentaux (1). Son incidence a augmenté au cours des 50 dernières années. Depuis 1997, la gemcitabine est le seul traitement approuvé de première ligne pour les patients atteints de cancer du pan-

créas résécable, localement avancé ou métastatique (2). Cependant, le taux de survie à 5 ans est de seulement 2 %, avec des taux de survie à 1 an de 17 à 23 %. (2). Récemment, des essais de phase II et III explorant des combinaisons à base de gemcitabine et d'erlotinib (Moore et al., 2007), FOLFIRINOX (Conroy et al., 2011) ou nab-paclitaxel (Von Hoff et al., 2013)

### Correspondance :

Pierre Cordelier, Cancer Research Centre of Toulouse - CRCT - UMR1037 - Inserm/Université Toulouse III - Paul Sabatier - ERL5294 CNRS - 2, avenue Hubert Curien - Oncopole entrée C - Bureau A3-10 CS 53717 - 31037 Toulouse Cedex 1.  
E-mail : pierre.cordelier@inserm.fr

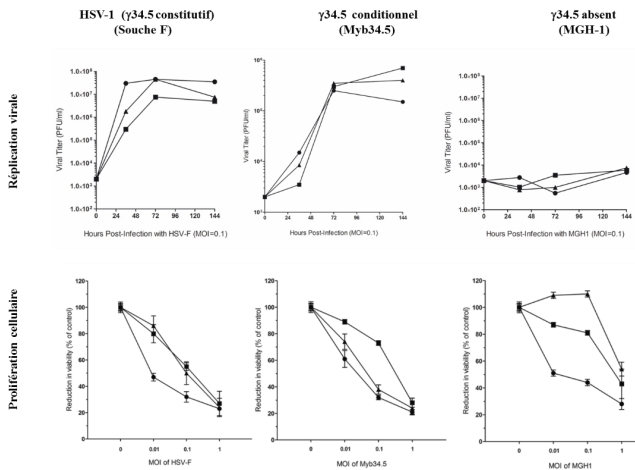


Figure 1. Activité répliquative (haut) et antiproliférative (bas) du virus HSV-1 sauvage (gauche) du virus HSV-1 conditionnel (milieu) et du virus HSV-1 doublement muté.

ont permis d'améliorer la survie globale des patients atteints de tumeurs avancées. La prise en charge du cancer du pancréas demeure donc une impasse thérapeutique, malgré les efforts combinés des médecins et des chercheurs. À ce jour, les projets de séquençage massif des tumeurs et l'exploration de nouvelles pistes thérapeutiques n'ont pas apporté les résultats escomptés. Pourtant, des études précliniques très encourageantes font état de l'efficacité de biothérapies ciblant directement la cellule tumorale ou son microenvironnement, bouclier « naturel » facilitant non seulement la progression cancéreuse, mais protégeant également les cellules tumorales de l'action des molécules thérapeutiques. Malheureusement, aucun bénéfice clinique majeur n'a été observé lors des essais cliniques précoces, alors que l'objectif biologique semblait avoir été atteint (3). En l'état actuel des choses, le cancer du pancréas deviendrait la seconde cause de décès par cancer en 2020, et peut-être même la première cause de mort par cancer aux USA en 2030 (4). Il est donc toujours aussi urgent de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques innovantes et efficaces pour ce cancer.

### Thérapie génique et virothérapie

Dans ce contexte très sombre, la thérapie génique fait office d'alternative thérapeutique innovante très prometteuse (5). Par définition, la thérapie génique est la fille de la génomique, qui en est l'indispensable préalable. Le défi de la thé-

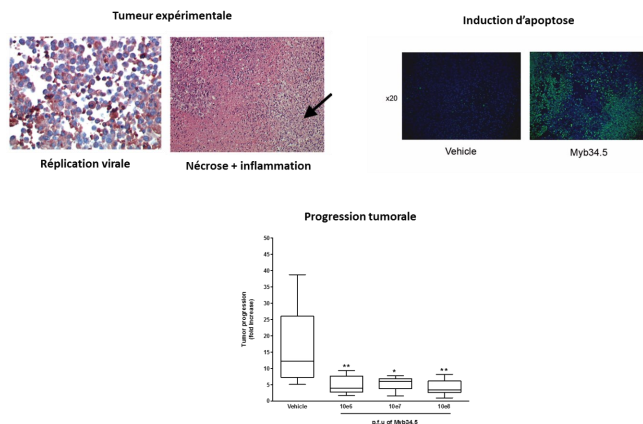
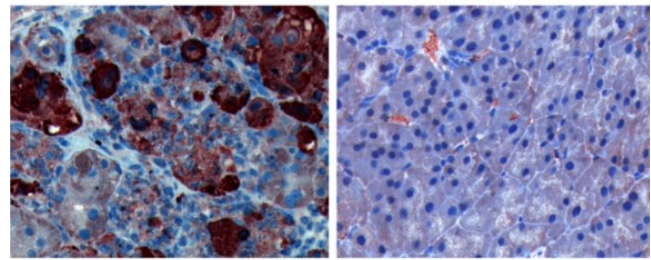


Figure 3. Activité antitumorale du virus ciblé Myb34.5 dans un modèle expérimental de cancer du pancréas.

### Pancréas sain



HSV-1 (γ34.5 constitutif) (Souche F)

γ34.5 conditionnel (Myb34.5)

Figure 2. Détection du virus HSV-1 sauvage (gauche) et du virus HSV-1 conditionnel (droite) après infection d'un pancréas sain de souris.

rapie génique est de parvenir à corriger, à l'intérieur des cellules d'un organisme humain, les anomalies qui, en affectant son génome ou son épigénome, sont responsables de pathologies graves et, le plus souvent, incurables. Le constat est sensiblement différent quand on évoque la thérapie génique anticancéreuse ; la thérapie génique anticancéreuse se doit en théorie de corriger la quasi-totalité de la masse tumorale pour espérer un bénéfice thérapeutique. Les vecteurs disponibles à l'heure actuelle sont bien loin de pouvoir proposer une telle efficacité, mais les progrès sont constants dans ce domaine. Cette condition *sine qua non* peut être tempérée lorsqu'on transfère des gènes thérapeutiques, ou des combinaisons thérapeutiques faisant notamment intervenir une chimiothérapie « activable », à fort pouvoir antitumoral de voisinage (ou effet *bystander*), qui concernent non seulement la cellule cible, mais aussi ses voisines. Autre possibilité, l'utilisation de virus génétiquement modifiés capables d'infecter spécifiquement les cellules tumorales et de s'y répliquer, propageant ainsi l'infection et donc la réponse thérapeutique par destruction cellulaire cancéreuse. En effet, les virus génétiquement modifiés présentant un « tropisme » tumoral sont capables d'infecter et de répliquer spécifiquement dans les tumeurs, et d'entraîner la mort des cellules cancéreuses et la régression de tumeurs expérimentales. Ceci est rendu possible par l'affranchissement des cellules tumorales au cours de la carcinogenèse de certaines barrières antitumorales (telle que la réponse aux interférons de type 1) qui sont autant de puissants inhibiteurs de la répli-

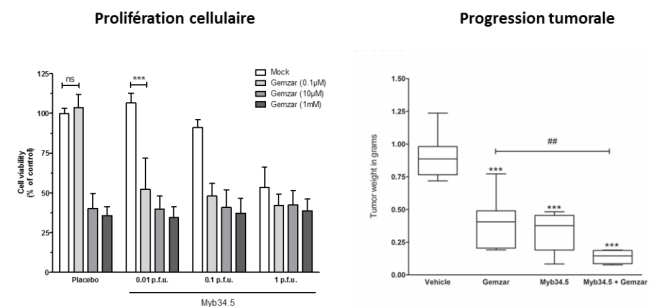


Figure 4. Activité antitumorale du virus ciblé Myb34.5 combiné au traitement par chimiothérapie dans un modèle expérimental de cancer du pancréas.

cation virale. Ainsi, le virus n'est plus limité dans sa prolifération au sein de la cellule cancéreuse, alors que son infection est abortive dans la cellule normale adjacente, limitant ainsi en théorie les effets secondaires néfastes. Ce type d'approche de virothérapie anticancéreuse est en plein essor, avec une quinzaine d'essais cliniques réalisés ou en cours depuis 2003 (6). Dans ce contexte, le reovirus thérapeutique conditionnel Reolysin, utilisé *in vivo* en phase 3 chez des patients présentant une tumeur mutée pour *KRAS*, serait capable de déclencher un stress du reticulum endoplasmique dans la tumeur et d'augmenter la survie des patients (7). Plus récemment, note groupe a démontré l'intérêt d'utiliser les virus oncolytiques dérivés de l'Herpès Simplex I pour le traitement de tumeurs pancréatiques expérimentales (8). Notre choix s'est porté sur cette souche virale car : i) les virus HSV-1 sont de grande taille permettant ainsi leur modification génétique afin d'assurer le ciblage des cellules cancéreuses, ii) leur innocuité a déjà été démontré chez l'homme lors d'essais cliniques, iii) ils répliquent très rapidement dans les cellules tumorales et enfin, iv) il est possible de les neutraliser par l'ajout d'acyclovir en cas d'effets secondaires non désirés. Plus précisément, le virus Myb34.5 que nous avons utilisé est un virus oncolytique herpétique de seconde génération dans lequel le gène ICP6, codant pour une ribonucléotide reductase virale, est muté et l'expression de la protéine virale  $\gamma_134.5$  est sous le contrôle du promoteur cellulaire B-Myb. Ces modifications du génome assurent i) une réplication virale seulement dans les cellules présentant une très forte activité ribonucléotide reductase endogène (comme c'est le cas des cellules tumorales notamment pancréatiques) et ii) l'inhibition de la réponse antivirale dirigée par l'IFN dans les cellules surexprimant B-Myb. Dans un premier temps, nous avons validé la réplication et l'activité antiproliférative du virus ciblé Myb34.5 dans trois lignées cellulaires différentes dérivées de cancer du pancréas (Fig 1). Nous avons utilisé comme témoin la souche virale parentale (HSV-1 souche F) et le virus MGH1 (dont dérive Myb34.5) dont le génome est muté pour ICP6 et  $\gamma_134.5$ .

## Résultats

Nos résultats démontrent que le virus ciblé Myb34.5 réplique à fort taux dans les cellules cancéreuses pour inhiber leur prolifération. Les virus parentaux (souche F) et ciblés (Myb34.5) ont ensuite été injectés dans le pancréas sain de souris athymique. Les résultats démontrent une très forte réplication virale dans le parenchyme sain après injection du virus sauvage, confirmée par la détection de protéine virale par immunohistochimie (coloration rouge). Au contraire, le virus ciblé Myb34.5 ne réplique pas dans le pancréas normal (Fig 2).

Nous avons ensuite déterminé l'activité thérapeutique des virus oncolytiques dans des modèles de tumeurs expérimentales pancréatiques. Pour cela, des cellules humaines dérivées de cancer pancréatique ont été greffées dans le pancréas de souris athymiques. Une fois les tumeurs développées, nous avons procédé à l'injection de dose croissante de virus Myb34.5. Dans un premier temps, nous avons pu mettre en évidence la présence de cellules cancéreuses infectées en réponse à l'injection du virus thérapeutique (Fig 3). Ces tumeurs sont aussi caractérisées par la présence de plages massives de nécrose et d'infiltrat inflammatoire. Nous avons mesuré la progression tumorale 15 jours après l'injection et pu mettre en évidence une diminution drastique de la taille des tumeurs et une induction de mort cellulaire par apoptose (marquage fluorescent de la protéine caspase-3 clivée) en réponse au traitement (Fig 3).

## Discussion

Comme mentionné précédemment, pour les patients atteints de cancer du pancréas dont la prise en charge sera palliative, trois types de chimiothérapie pourront leur être proposés en fonction de leur état général. Si la gemcitabine présente la survie médiane la plus faible (autour de 6,7 mois), elle est néanmoins la mieux tolérée, en effet en association au Nab-Paclitaxel la survie est de 8,5 mois mais avec d'avantage d'effets indésirables. Le FOLFIRINOX améliore le pronostic, avec une survie médiane à 11,1 mois, mais a une toxicité qui limite son indication. Au vu de ces éléments de toxicité et d'efficacité des chimiothérapies pour ce cancer dont l'âge moyen de survenue est entre 60 et 70 ans, une place thérapeutique existe dans l'élaboration de nouveaux traitements en association à la gemcitabine. Par conséquent, nous avons élaboré un protocole de traitement combinant la gemcitabine et le virus ciblé Myb34.5. *In vitro*, cela se traduit par une meilleure efficacité de la chimiothérapie, à faible dose de virus (Fig 4). *In vivo*, nous avons pu mesurer une augmentation significative de la réponse antitumorale lorsque les deux approches thérapeutiques sont combinées (Fig 4).

## Conclusion

Ce travail démontre l'intérêt de l'utilisation de virus oncolytiques ciblés pour le traitement de tumeurs expérimentales pancréatiques. Des études complémentaires, notamment dans des modèles précliniques plus élaborés prenant en compte la réponse immunitaire antivirale et antitumorale, seront nécessaires dans un futur proche avant de proposer Myb34.5 comme une nouvelle modalité thérapeutique pour la prise en charge des patients atteints de cancer du pancréas inopérable. On peut penser que nous sommes à l'aube de découvertes remarquables dans le domaine du cancer du pancréas. La thérapie génique, en combinaison avec d'autres approches innovantes remettant la cellule cancéreuse au centre des recherches devrait apporter tôt ou tard les moyens d'enrayer ce terrible fléau social, familial et économique.

## Références

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA. Cancer J. Clin.* 2013;63:11-30.
2. Burris HA 3rd et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 1997;15:2403-13.
3. Garrido-Laguna I, Hidalgo M. Pancreatic cancer: from state-of-the-art treatments to promising novel therapies. *Nat Rev Clin Oncol.* 2015;12:319-34.
4. Rahib L et al. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res.* 2014;74:2913-21.
5. Vassaux G et al. The promise of gene therapy for pancreatic cancer. *Hum. Gene Ther.* [published online ahead of print: November 25, 2015]; doi:10.1089/hum.2015.141
6. Pol J et al. Trial Watch: Oncolytic viruses for cancer therapy. *Oncoimmunology* 2014;3:e28694.
7. Mahalingam D et al. The combination of intravenous Reolysin and gemcitabine induces reovirus replication and endoplasmic reticular stress in a patient with *KRAS*-activated pancreatic cancer. *BMC Cancer* 2015;15:513.
8. Gayral M et al. Targeted Oncolytic Herpes Simplex Virus Type 1 Eradicates Experimental Pancreatic Tumors. *Hum. Gene Ther.* 2015;26:104-13