

# Oxygène et réplication virale

F. MORINET<sup>1</sup>, C. CAPRON<sup>2</sup>, S. PILLET<sup>3</sup>

## RÉSUMÉ

La biologie de l'oxygène est bien étudiée depuis 60 ans en cancérologie pour pallier à la résistance des tumeurs solides à la chimiothérapie et la radiothérapie. Les travaux de Pasteur publiés en 1861 sur la fermentation microbienne et la mise au point de jarres anaérobies en 1916, sont des travaux pionniers sur l'oxygène en bactériologie. Il faut attendre, à notre connaissance, le début du XX<sup>ème</sup> siècle pour voir des travaux publiés en virologie ayant trait à la croissance ou non de virus en l'absence d'oxygène. En 1992, Gregg Semenza a identifié un facteur majeur de réponse à l'oxygène, le facteur HIF-1 $\alpha$  (HIF pour « *hypoxia inductible factor* ») ; ce facteur de transcription peut constituer une cible thérapeutique en complément des chimiothérapies antivirales classiques face à l'émergence inéluctable de virions résistants. Par ailleurs, la culture de prélèvements virologiques en conditions standard d'oxygénation (20 % d'oxygène) mais aussi en hypoxie (1 % d'oxygène) pourrait permettre de cultiver des virus réputés non cultivables, voire d'isoler de nouveaux virus.

**MOTS-CLÉS :** oxygène, virus, HIF-1 $\alpha$ , chimiothérapie, diagnostic, culture cellulaire.

## I. - INTRODUCTION

Au début des années 2000, en lien avec les travaux de recherche de notre groupe sur le parvovirus humain B19 – un virus au tropisme particulier pour les progéniteurs érythroïdes –, nous suivions avec intérêt les données publiées dans la revue d'hématologie américaine *Blood* consacrées à l'existence d'un gradient en oxygène au sein du tissu hématopoïétique. À la même époque, nous étions également intrigués par le fait que certains parvovirus animaux étaient oncolytiques pour les tumeurs solides, alors que ces dernières sont en hypoxie.

Ces données nous ont amenés à étudier l'impact de la tension en oxygène sur la réplication du parvovirus B19 dans des cellules primaires érythroïdes, un travail qui nous a permis de montrer que l'hypoxie (1 % en oxygène) majorait l'expression de ce virus (1). Ce travail pionnier en virologie a depuis été largement confirmé par d'autres équipes, et a ouvert sur la question plus large des relations entre oxygène et virus.

L'objectif de cet article est d'initier le lecteur non spécialiste à ce « nouvel aspect » de la physiologie virale. Pour plus de détails, nous renvoyons le lecteur à la mini-revue exhaustive que nous avons publiée en 2013 sur ce sujet (2).

## II. - OXYGÈNE ET BIOLOGIE CELLULAIRE

La pratique de la culture cellulaire a fait appel au contrôle du pH dans le milieu de culture, ainsi qu'à une évaluation très précise des concentrations en facteurs de croissance et en acides aminés (3) ; très peu d'attention a été apportée à la concentration en oxygène en virologie, en dehors d'un travail pionnier publié en 1936 suggérant que l'hypoxie avait un effet inhibiteur sur la réplication *in vitro* du virus grippal (4).

La tension en oxygène est de 20 % dans l'air ambiant (160 mm Hg). La pression partielle en oxygène (pO<sub>2</sub>) diminue au niveau pulmonaire pour atteindre 2 à 9 % (14 à 65 mm Hg) dans les tissus (5), ce qui correspond à une hypoxie physiologique. Dans la niche hématopoïétique, la pO<sub>2</sub> oscille entre 1 et 6 % ; un tel gradient ne peut être que bénéfique aux cellules souches car il réduit le stress

<sup>1</sup> Hôpital Saint-Louis, Pôle Biologie-Pathologie-Physiologie, Université Denis Diderot, Paris.

<sup>2</sup> Hôpital Ambroise Paré, Laboratoire d'Immunologie et d'Hématologie, Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines.

<sup>3</sup> CHU de Saint-Étienne, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, Université Jean Monnet, Saint-Étienne.

oxydatif, et donc le risque de mutations, et il maintient le caractère totipotent des cellules souches (6, 7). La culture *in vitro* de cellules souches hématopoïétiques à faible pO<sub>2</sub> permettrait en retour une meilleure prise de greffe, au moins dans les modèles murins (8). Par analogie avec les cellules souches hématopoïétiques, les cellules souches mésenchymateuses originaires de la moelle osseuse ou d'autres tissus commencent à être utilisées en thérapeutique essentiellement à des fins immunosuppressives et anti-inflammatoires ; la culture en hypoxie améliore leur prolifération et donc la quantité de cellules susceptibles d'être injectées lors de pathologies autoimmunes, comme le montre la mise en route de 350 essais cliniques dans ce domaine (ClinicalTrials.gov) (9, 10).

La présence de cellules à faible pO<sub>2</sub> dans les tumeurs solides humaines est bien établie depuis 50 ans (11) ; cette hypoxie tumorale est source de résistance à la radiothérapie et à la chimiothérapie, ce qui a conduit certaines équipes à employer l'oxygène hyperbare pour sensibiliser les tumeurs solides à la radiothérapie, mais sans résultats réellement convaincants. En ce qui concerne la chimiothérapie, les cellules hypoxiques sont résistantes au traitement pour au moins quatre raisons : i) elles sont distantes des vaisseaux sanguins et donc moins susceptibles de recevoir le médicament ; ii) du fait de ce défaut de perfusion, les cellules hypoxiques se divisent moins ; iii) l'hypoxie « sélectionne » les cellules qui sont résistantes à l'apoptose médiée par p53 ; iv) l'hypoxie favorise l'expression de la glycoprotéine P, qui assure l'efflux du médicament.

À l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode idéale pour identifier et traiter les tumeurs hypoxiques en pathologie humaine.

### III. - LE FACTEUR HIF- $\alpha$

En 1992, Gregg Semenza a mis en évidence qu'en conditions d'hypoxie, une protéine se fixait dans la région « *enhancer* » du gène codant pour l'érythropoïétine. Ce facteur de transcription fut appelé « *hypoxia inducible factor* » (HIF) (12). On s'aperçut plus tard qu'il s'agissait en fait d'un hétérodimère constitué d'une sous-unité alpha (HIF-1 $\alpha$ ), inductible par l'hypoxie, et d'une sous-unité bêta (HIF-1 $\beta$ ), constitutive. Les tumeurs solides étant en hypoxie, le complexe HIF-1 $\alpha$ /HIF-1 $\beta$  joue un rôle fondamental dans la progression tumorale et l'angiogenèse réactionnelle en transactivant le promoteur du « *vascular endothelial growth factor* » (VEGF). Le motif reconnu sur la séquence d'ADN est 5'-RCGTG-3'. En situation de normoxie, HIF-1 $\alpha$  est dégradé suite à l'hydroxylation de ses deux prolines (Pro402 et Pro564) par des enzymes à domaine prolyl hydroxylase (*prolyl hydroxylase domain*, PHD), ce qui permet l'interaction avec la protéine suppressive de tumeur de Von Hippel Lindau (pVHL) ; cette dernière protéine est une ubiquitine ligase assurant la dégradation de HIF-1 $\alpha$  par le protéasome (13).

Les PHD sont des senseurs à l'oxygène ; on en distingue trois (PHD-1, PHD-2, PHD-3) dont l'expression dans les

tissus est ubiquitaire. Pour fonctionner comme hydroxylases, les PHD requièrent de l'oxygène, un substrat (le 2-oxoglutarate, 2-OG) et deux cofacteurs : le fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>) et l'acide ascorbique (14). Outre leur rôle de senseur à l'oxygène, elles sont sensibles à d'autres métabolites parmi lesquels les intermédiaires du cycle de l'acide tricarboxylique que sont le fumarate et le succinate, qui les inhibent et donc activent HIF-1 $\alpha$ . Effectivement, dans certains cancers s'accompagnant de mutations de la succinate déshydrogénase et de la fumarate hydratase, ces métabolites s'accumulent et concourent à la tumorigénèse par stabilisation de HIF-1 $\alpha$  (15).

En fait, en normoxie, il existe toujours une petite quantité de HIF-1 $\alpha$ , qui est alors stabilisé par l'oxyde nitrique (*nitric oxide*, NO) et les dérivés de l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS). Le NO diminue l'hydroxylation de HIF-1 $\alpha$  et donc sa liaison avec pVHL, annihilant sa dégradation par le protéasome (16). De plus, le NO peut interagir avec le Fe<sup>2+</sup> des PHD, inhibant l'hydroxylation des prolines de HIF-1 $\alpha$  (17). Les ROS peuvent interagir également avec le Fe<sup>2+</sup> des PHD en le rendant ferrique (Fe<sup>3+</sup>), inactivant également les PHD (18). Élément de complexité supplémentaire, le NO et les ROS s'antagonisent mutuellement, conduisant à une dégradation de HIF-1 $\alpha$ , et ce, toujours en normoxie.

### IV. - VIRUS ET OXYGÈNE

Nos expériences de cultures virales en conditions d'hypoxie remontent au tout début des années 2000. Dans ces expériences, les progéniteurs érythroïdes, cibles du parvovirus humain B19, sont infectés à une multiplicité d'infection de 0,1 et sont mis dans une enceinte plastique dans laquelle on fait passer le mélange de gaz suivant pendant 5 mn : 1 % d'O<sub>2</sub>, 5 % de CO<sub>2</sub> et 94 % de N<sub>2</sub>. Après fermeture des robinets d'entrée et de sortie, l'enceinte est placée dans une étuve à 37 °C. La majoration de l'expression virale en hypoxie est appréciée par immunofluorescence (production de virions infectieux), Northern-blot (effet transcriptionnel) et Southern-blot (production de formes répliquatives).

Ces études ont montré que l'hypoxie majorait d'un facteur d'environ 8 fois la répllication du parvovirus B19, un phénomène qui s'est avéré indépendant de HIF-1 $\alpha$  (absence de fixation de HIF-1 $\alpha$  sur un motif ACGTG du promoteur viral, par retard sur gel) (1). En 2011, l'équipe de Jianming Qiu a confirmé nos résultats et a montré que l'activation de l'expression virale du parvovirus B19 en conditions d'hypoxie faisait intervenir le facteur de transcription STAT5A et non HIF-1 $\alpha$  (19).

Effectivement, après dix ans de recul, on considère maintenant que si le facteur HIF-1 $\alpha$  est le facteur clé de transcription impliqué dans la réponse à l'hypoxie, il existe très probablement d'autres voies accessoires. Cela est encore suggéré par un travail récent sur le virus de l'hépatite C, où la majoration de l'expression de virus recombinants en conditions d'hypoxie est indépendante de HIF-1 $\alpha$  (20).

Néanmoins, HIF-1 $\alpha$  est impliqué majoritairement dans la régulation de l'expression de nombreux virus (2). Comme on l'a vu précédemment, précisons que HIF-1 $\alpha$  peut certes être stabilisé en conditions d'hypoxie, mais également en conditions de normoxie. Ainsi, le NO et les ROS produits lors d'infections par le virus respiratoire syncytial (VRS), le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), ou les virus des hépatites C (VHC) et B (VHB), stabilisent HIF-1 $\alpha$ , entretenant un état inflammatoire et activant le processus tumoral en ce qui concerne les virus des hépatites. D'autres virus comme le virus d'Epstein-Barr (EBV) et le virus de la vaccine (VV), inhibent l'activité des PHD, concourant également à la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  (21).

HIF-1 $\alpha$  stabilisé, outre l'activation de plus de 200 gènes cellulaires, transactive l'expression du VIH et de l'herpès-virus type 8 (HHV-8) ; l'HHV-8 est lui-même également capable de stimuler l'expression de HIF-1 $\alpha$  et il existe donc une boucle de régulation positive entre HHV-8 et HIF-1 $\alpha$ . HIF-1 $\alpha$  peut ainsi constituer une cible thérapeutique potentielle pour le VIH et HHV8, en supplément de la chimiothérapie conventionnelle.

L'immunité antivirale est également affectée mais de manière complexe par l'hypoxie. En effet, l'activité inflammatoire des macrophages est stimulée, alors que la réaction cellulaire TCD4<sup>+</sup> de type Th1 est inhibée et qu'il existe un blocage de la différenciation des lymphocytes TCD8 en cellules effectrices (22, 23).

## V. - VIROTHÉRAPIE ET HYPOXIE

L'idée d'utiliser des virus pour détruire des cellules cancéreuses remonte aux années 1950 (24). En fait, l'ère moderne de la « virothérapie » remonte à une publication de 1991 qui mentionne l'utilisation d'un virus herpes simplex atténué dans sa neurovirulence (thymidine kinase négatif) pour traiter le glioblastome dans un modèle murin de souris *nude* (25). Le glioblastome représente 30 % des tumeurs cérébrales chez l'homme, et la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie n'assurent qu'une survie de 5 % à 5 ans, justifiant des tentatives complémentaires basées sur l'utilisation de virus oncolytiques comme le parvovirus de rat H1 (26).

Curieusement, le fait que les tumeurs soient en conditions d'hypoxie ne semble pas avoir retenu l'attention des « virothérapeutes ». Un article de 2005 dans la revue *Gene Therapy* mentionne que l'hypoxie (1 % d'O<sub>2</sub>) réduit l'expression des protéines E1a et de la fibre de l'adénovirus *in vitro* ; l'inhibition se fait à un niveau post-transcriptionnel et/ou traductionnel (27). Cela pourrait expliquer le manque de succès des nombreux essais de virothérapie faisant appel à l'utilisation d'adénovirus recombinants pour traiter les tumeurs solides.

À l'inverse, la démarche effectuée sur l'oncolyse des réovirus est exemplaire. En 1998, il est publié que l'infec-

tion à réovirus est inhibée à une étape traductionnelle dans les cellules de souris NIH-3T3 et que cet obstacle est levé si les cellules NIH 3T3 sont transformées par l'oncogène *ras* (28). Dans les cellules NIH 3T3, suite à l'infection virale, la protéine kinase (PKR) est phosphorylée, ce qui inhibe la traduction virale ; par contre, après transformation par *ras* et suite à la cascade de signalisation induite par cet oncogène, la PKR n'est pas phosphorylée et la traduction virale peut ainsi s'effectuer.

Les réovirus pourraient ainsi être utilisés comme agents oncolytiques dans les nombreux cancers où la voie de signalisation Ras est activée, notamment les cancers coliques (29). L'intérêt de l'utilisation des réovirus est renforcé par le fait qu'il a été démontré récemment que ces virus infectent et tuent les cellules tumorales *in vitro* en conditions hypoxiques ; le mécanisme de mort viro-induite en hypoxie est caspase-indépendant (30).

## VI. - PERSPECTIVES

La régulation de l'expression virale par la tension oxygène pose trois questions.

Premièrement, faut-il, comme pour les bactéries et leur classification dans le « Bergey's manual », inclure dans la taxinomie virale des caractères métaboliques en plus des données physicochimiques standard ? Le virus grippal est un aérobic strict, les bactériophages du tube digestif se répliquent en anaérobiose, et le VIH, par exemple, se réplique aussi bien en aérobiose qu'à de faibles concentrations en oxygène.

Deuxièmement à notre sens, comme en bactériologie et ce pratiqué depuis au moins 1916, date de mise au point des jarres anaérobies (31), il paraîtrait opportun d'inoculer les prélèvements biologiques à la recherche de « nouveaux virus » dans un contexte infectieux mal défini, non seulement en 20 %, mais également en 1 % d'oxygène (32).

Enfin, comme la grande majorité des virus en pathologie humaine voient leur répllication virale amplifiée par HIF-1 $\alpha$ , faut-il utiliser des inhibiteurs de ce facteur de transcription en complément de la chimiothérapie classique ? Ce dernier aspect a fait l'objet d'un programme hospitalier de recherche clinique (PHRC) multicentrique qui vient d'être financé par l'Institut National du Cancer, visant à utiliser la digoxine – glycoside cardiaque inhibiteur de HIF-1 $\alpha$  – pour le traitement du sarcome de Kaposi classique et endémique, hors VIH. En effet, HIF-1 $\alpha$  est un puissant activateur de l'angiogenèse, qui tient une place importante dans l'évolution du sarcome de Kaposi, et un activateur de l'expression de HHV-8.

Ces trois axes – classification, diagnostic et thérapeutique – constituent des éléments stimulants pour approfondir la biologie de l'oxygène et son impact dans les infections virales humaines.

**Conflit d'intérêt** : aucun.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Pillet S, Le Guyader N, Hofer T, Nguyenkhac F, Koken M, Aubin JT, Fichelson S, Gassmann M, Morinet F. Hypoxia enhances human B19 erythrovirus gene expression in primary erythroid cells. *Virology* 2004 ; **327** : 1-7.
- (2) Morinet F, Casetti L, François JH, Capron C, Pillet S. Oxygen tension level and human viral infections. *Virology* 2013 ; **444** : 31-6.
- (3) Carrel A. On the permanent life of tissues outside of the organism. *J Exp Med* 1912 ; **15** : 516-28.
- (4) Magill TP, Francis T. Studies with human influenza virus cultivated in artificial medium. *J Exp Med* 1936 ; **63** : 803-11.
- (5) Brahim-Horn MC, Pouyssegur J. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett* 2007 ; **581** : 3582-91.
- (6) Busuttill RA, Rubio M, Dolle ME, Campisi J, Vijg J. Oxygen accelerates the accumulation of mutations during the senescence and immortalization of murine cells in culture. *Aging Cell* 2003 ; **2** : 287-94.
- (7) Ezashi T, Das P, Roberts RM. Low O<sub>2</sub> tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 ; **102** : 4783-8.
- (8) Speth JM, Hoggatt J, Singh P, Pelus LM. Pharmacologic increase in HIF-1 $\alpha$  enhances hematopoietic stem and progenitor homing and engraftment. *Blood* 2014 ; **123** : 203-7.
- (9) Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell* 2013 ; **13** : 392-402.
- (10) Némós C, Basciano L, Dalloul A. Effet et applications potentielles de la culture des cellules souches mésenchymateuses de moelle osseuse en condition d'hypoxie. *Path Biol* 2012 ; **60** : 193-8.
- (11) Thomlison RH, Gray LH. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Brit J Cancer* 1955 ; **9** : 539-49.
- (12) Semenza G, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via *de novo* protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992 ; **12** : 5447-54.
- (13) Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ. The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999 ; **6733** : 271-5.
- (14) Wong BW, Kuchnio A, Bruning U, Carmeliet P. Emerging novel functions of the oxygen-sensing prolyl hydroxylase domain enzymes. *TIBS* 2013 ; **38** : 3-11.
- (15) Kaelin WG, Jr. Cancer and altered metabolism: potential importance of hypoxia-inducible factor and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2011 ; **76** : 335-45.
- (16) Metzén E, Zhou J, Jelkmann W, Fandrey J, Brüne B. Nitric oxide impairs normoxic degradation of HIF-1 $\alpha$  by inhibition of prolyl hydroxylases. *Mol Biol Cell* 2003 ; **14** : 3470-81.
- (17) Grisham MB, Jour'd'Heuil D, Wink DA. Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol* 1999 ; **276** : G315-21.
- (18) Zepeda AB, Pessoa A Jr, Castillo RL, Figueroa CA, Pulgar VM, Farias JG. Cellular and molecular mechanisms in the hypoxic tissue: role of HIF-1 and ROS. *Cell Biochem Funct* 2013 ; **31** : 451-9.
- (19) Chen AY, Kleiboeker S, Qiu J. Productive parvovirus B19 infection of primary human erythroid progenitor cells at hypoxia is regulated by STAT5A and MEK signaling but not HIF $\alpha$ . *PLoS Pathogens* 2011 ; **7** : e1002088.
- (20) Vassilaki N, Kalliampakou KI, Kotta-Loizou I, Befani C, Liakos P, Simos G, Mentis AF, Kalliaropoulos A, Doumba PP, Smirlis D, Foka P, Bauhofer O, Poenisch M, Windisch MP, Lee ME, Koskinas J, Bartenschlager R, Mavromara P. Low oxygen tension enhances hepatitis C virus replication. *J Virol* 2013 ; **87** : 2935-48.
- (21) Mazon M, Peters NE, Loenarz C, Krysztofinska EM, Ember SW, Ferguson BJ, Smith GL. Mechanism for induction of a hypoxic response by vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013 ; **110** : 12444-9.
- (22) Morinet F, Casetti L, Mazure N, Pillet S. Hepatitis C virus, the immune system and hypoxia. *J Clin Invest* 2013 ; **123** : 4121 (e-letter).
- (23) Doedens AL, Phan AT, Stradner MH, Fujimoto JK, Nguyen JV, Yang E, Johnson RS, Goldrath AW. Hypoxia-inducible factors enhance the effector responses of CD8<sup>+</sup> T cells to persistent antigen. *Nat Immunol* 2013 ; **14** : 1173-82.
- (24) Russell SJ, Peng KW, Bell JC. Oncolytic virotherapy. *Nat Biotech* 2012 ; **30** : 1-13.
- (25) Martuza RL, Mallick A, Markert JM, Ruffner KL, Coen DM. Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science* 1991 ; **252** : 854-6.
- (26) Nüesch JPF, Lacroix J, Marchini A, Rommelaere J. Molecular pathways: rodent parvoviruses-mechanisms of oncolysis and prospects for clinical cancer treatment. *Clin Cancer Res* 2012 ; **18** : 3516-23.
- (27) Pipiya T, Sauthoff H, Huang YQ, Chang B, Cheng J, Heitner S, Chen S, Rom WN, Hay JG. Hypoxia reduces adenoviral replication in cancer cells by down regulation of viral protein expression. *Gene Therapy* 2005 ; **12** : 911-7.
- (28) Strong JE, Coffey MC, Tang D, Sabinin P, Lee PWK. The molecular basis of viral oncolysis: usurpation of the Ras signaling pathway by reovirus. *Embo J* 1998 ; **17** : 3351-62.
- (29) Zenonos K, Kyprianou K. RAS signaling pathways, mutations and their role in colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol* 2013 ; **5** : 97-101.
- (30) Figova K, Hrabeta J, Eckschlager T. Anticancer efficiency of reovirus in normoxia and hypoxia. *Folia Biologica (Praha)* 2013 ; **59** : 68-75.
- (31) McIntosh J, Fildes P. A new apparatus for the isolation and cultivation of anaerobic micro-organisms. *Lancet* 1916 ; **1** : 768-70.
- (32) Morinet F, Capron C, Mazure N, Pillet S. Why do some viruses remain recalcitrant to cultivation? *Clin Infect Dis* 2014 ; **58** : 752-3.