



Université de Strasbourg
FACULTE DE PHARMACIE

N° d'ordre : _____

**MEMOIRE DE DIPLOME D'ETAT DE
DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Conception de virus oncolytiques multifonctionnels dans
le traitement du cancer : exemple d'invir.IO®**

Présenté par

Anaëlle PAILLART

Soutenu le 13 octobre 2023 devant le jury constitué de

Maxime LEHMANN, Professeur, Président

Christophe ANCEL, Pharmacien, Directeur de thèse

Emmanuel BOUTANT, Docteur, membre du jury

Dorian MISSY, Pharmacien, membre du jury

Approuvé par le Doyen et
par le Président de l'Université de Strasbourg



Doyen : Esther KELLENBERGER

Directeurs adjoints Julien GODET
Béatrice HEURTAULT
Emilie SICK

Directeur adjoint étudiant : Léo FERREIRA-MOURIAUX

LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT-CHERCHEUR

Professeurs :

Philippe	BOUCHER	Physiologie
Nathalie	BOULANGER	Parasitologie
Lina	BOUREL	Chimie thérapeutique
Pascal	DIDIER	Biophotonique
Saïd	ENNAHAR	Chimie analytique
Philippe	GEORGEL	Bactériologie, Virologie
Jean-Pierre	GIES	Pharmacologie moléculaire
Béatrice	HEURTAULT	Pharmacie galénique
Esther	KELLENBERGER	Bio-informatique
Maxime	LEHMANN	Biologie cellulaire
Eric	MARCHIONI	Chimie analytique
Francis	MEGERLIN	Droit et économie pharm.
Yves	MELY	Physique et Biophysique
Jean-Yves	PABST	Droit Economie pharm.
Françoise	PONS	Toxicologie
Valérie	SCHINI-KERTH	Pharmacologie
Florence	TOTI	Pharmacologie
Thierry	VANDAMME	Bioalénique
Catherine	VONTHRON	Pharmacognosie
Pascal	WEHRLÉ	Pharmacie galénique

Professeurs-praticiens hospitaliers

Jean-Marc	LESSINGER	Biochimie
Bruno	MICHEL	Pharm. clinique santé publique
Pauline	SOULAS-SPRAUEL	Immunologie
Geneviève	UBEAUD-SÉQUIER	Pharmacocinétique

PAST :

Matthieu	FOHRER	Pharmacie d'officine
Philippe	GALAIS	Droit et économie pharm.
Philippe	NANDE	Ingénierie pharmaceutique
Caroline	WILLER - WEHRLÉ	Pharmacie d'officine

Maîtres de Conférences :

Nicolas	ANTON	Pharmacie bioalénique
Martine	BERGAENTZLÉ	Chimie analytique
Elisa	BOMBARDA	Biophysique
Auréli	BOURDERIUX	Pharmacochimie
Emmanuel	BOUTANT	Virologie et Microbiologie
Véronique	BRUBAN	Physiologie et physiopath.
Anne	CASSET	Toxicologie
Thierry	CHATAIGNEAU	Pharmacologie
Manuela	CHIPER	Pharmacie bioalénique
Guillaume	CONZATTI	Pharmacie galénique
Marcella	DE GIORGI	Pharmacochimie
Serge	DUMONT	Biologie cellulaire
Valérie	GEOFFROY	Microbiologie
Gisèle	HAAN-ARCHIPOFF	Plantes médicinales
Célien	JACQUEMARD	Chémoinformatique
Julie	KARPENKO	Pharmacochimie
Clarisse	MAEHLING	Chimie physique
Rachel	MATZ-WESTPHAL	Pharmacologie
Cherifa	MEHADJI	Chimie
Nathalie	NIEDERHOFFER	Pharmacologie
Sergio	ORTIZ AGUIRRE	Pharmacognosie
Sylvie	PERROTEY	Parasitologie
Romain	PERTSCHI	Chimie en flux
Frédéric	PRZEBILLA	Biostatistiques
Patrice	RASSAM	Microbiologie
Eléonore	REAL	Biochimie
Andreas	REISCH	Biophysique
Ludivine	RIFFAULT-VALOIS	Analyse du médicament
Carole	RONZANI	Toxicologie
Emilie	SICK	Pharmacologie
Maria-Vittoria	SPANEOODA	Chimie thérapeutique
Jérôme	TERRAND	Physiopathologie
Nassera	TOUNSI	Chimie physique
Auréli	URBAIN	Pharmacognosie
Bruno	VAN OVERLOOP	Physiologie
María	ZENIQU	Chimioqénomique

Maîtres de conférences - praticiens hospitaliers

Julie	BRUNET	Parasitologie
Nelly	ÉTIENNE-SELLOUM	Pharmacologie- pharm. clinique
Julien	GODET	Biophysique - Biostatistiques

Assistants hospitaliers universitaires

Damien	REITA	Biochimie
--------	-------	-----------

SERMENT DE GALIEN

JE JURE,

en présence des Maîtres de la Faculté,
des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens
et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit
dans les préceptes de mon art et de
leur témoigner ma reconnaissance en
restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique,
ma profession avec conscience et de respecter non
seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles
de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne dévoiler à personne les secrets
qui m'auront été confiés et dont j'aurai eu
connaissance dans la pratique de mon art.

Si j'observe scrupuleusement ce serment,
que je sois moi-même honoré
et estimé de mes confrères
et de mes patients.

REMERCIEMENTS

A mon Président du jury, Monsieur le Professeur Maxime Lehmann,

Je vous remercie d'avoir accepté d'être mon président de thèse. Merci pour vos enseignements à la faculté de pharmacie et également de vos passages réguliers (en tout cas à mon époque) à la K'fet de pharmacie.

A mon directeur de thèse, Docteur Christophe Ancel,

Je te remercie d'avoir accepté de diriger et d'encadrer ce dernier travail de ces longues années de pharmacie. Merci d'avoir pris le temps de lire cet écrit et de toujours être présent pour mes questions, que ce soit dans le cadre de ce travail ou à Transgene.

Au membre du jury, Docteur Emmanuel Boutant

Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Je vous remercie également de votre implication auprès des étudiants et de votre accessibilité pendant toutes nos études. Au plaisir de vous recroiser lors de mes passages à la faculté.

Au membre du jury, Docteur Dorian Missy

Je te remercie de faire partie de ce jury pour ce dernier moment étudiant. Merci également de ton aide durant mes débuts dans la vie professionnelle et de m'avoir fait découvrir le monde de la biotechnologie et des virus oncolytiques.

A ma famille, Papa, Maman, Maxence et Helen, merci d'avoir toujours été présent dans ma vie et de me soutenir dans mes décisions. Maman, nos sessions de japonais et de puzzles me font toujours plaisir et nous font bien rigoler, j'espère garder cette complicité encore longtemps. Papa, Helen, les délicieux repas ou les voyages au ski pour lesquels vous m'invitez sont toujours agréables. Maxence, il faut vraiment que je vienne à Lille, maintenant que cette thèse est fini ça sera beaucoup plus simple :p. Merci pour tous les moments qu'on a pu passer ensemble étant petit et nos sessions jeux vidéo de l'époque (faut vraiment que je commence Zelda). A tous, je ne vous le dis pas assez mais merci d'être là, je vous aime.

Petit remerciement également à Dama, qui a été le meilleur soutien lors de l'écriture de cette thèse.

A mes amis de pharma, en premier les biatchoins, Juliette, Louis, Samuel, Riess et Ricci merci de votre présence quotidienne sur la conversation, ça me fait toujours plaisir et bien rire même si Louis ne donne

pas toujours des nouvelles (jtm bb). Merci d'être toujours là pour les moments joyeux comme difficile, j'espère qu'on restera comme ça encore pour beaucoup d'année.

Aux rectums destroyers, la meilleure promo de pharma, merci de tous les moments qu'on a pu passer ensemble pendant nos études et de répondre encore présent aujourd'hui lors des événements. Vous avez fait partie des personnes qui ont permis de me faire passer les meilleurs moments étudiants de ma vie. Au plaisir de vous recroiser autour d'un bon p'tit obus... (ou d'une meilleure bière maintenant qu'on a la thune). PS : Manu, je n'oublie pas notre pari.

A mes amis rescapés de la fac de bio et ceux de primaire / lycée, vous n'êtes plus nombreux mais c'est les meilleurs qui restent. Merci d'avoir été là et de répondre présent également aujourd'hui pour la plupart, au plaisir de vous recroiser aux quatre coins d'Europe.

A la belle dame de l'H2S, merci de ces deux années passées. Tu m'as permis de me découvrir, de me lancer dans des défis inimaginables et de rencontrer de magnifiques personnes. Merci à toutes les personnes qui ont pu partager ces années avec moi.

A mes collègues de Transgene que je vois maintenant plus que mes amis et ma famille, merci d'être présent au quotidien. Une pensée particulière à Elena, Gabriel et Maxime qui sont maintenant devenu des amis et avec qui je suis ravie de partager plein d'activités. J'espère vous voir encore longtemps (ouais vous n'allez pas vous débarrasser de moi comme ça !)

Enfin merci à tous mes autres amis, Chloé, Louise, Justine, Jeffrey et tous les autres que j'oublie mais vous vous reconnaitrez, merci pour tout, ça me fait toujours plaisir de vous revoir autour d'un verre ou d'un repas, vous êtes tout aussi cher à mon cœur.

Table des matières

PARTIE I : IMMUNOTHERAPIE ET VIRUS ONCOLYTIQUE.....	13
I. CONTEXTE	13
A. <i>Cancer et réponses immunitaires.....</i>	13
1. Les caractéristiques du cancer.....	13
2. Réponses immunitaires	15
3. Traitements actuels	20
B. <i>Immunothérapie anticancéreuse</i>	22
1. Les anticorps monoclonaux.....	22
2. Les cellules CAR-T	24
3. L’immunothérapie oncolytique	25
II. VIRUS ONCOLYTIQUES.....	26
A. <i>Description du virus de la vaccine</i>	26
B. <i>TG6002</i>	28
1. Modifications réalisées.....	28
2. Mécanisme d’action.....	29
C. <i>BT-001</i>	29
1. Modifications réalisées.....	29
2. Mécanisme d’action.....	30
III. RESULTATS ESSAIS PRECLINIQUES ET CLINIQUES	32
A. <i>Déroulement d’une étude clinique</i>	32
B. <i>Résultats TG6002</i>	33
1. Pré-clinique.....	33
2. Clinique	34
C. <i>Résultats BT-001</i>	36
1. Pré-clinique.....	36
2. Clinique	39
PARTIE II : PROCESSUS DE PRODUCTION SPECIFIQUE	41
I. PRODUCTION DE MEDICAMENT INJECTABLE	41
A. <i>Le contexte réglementaire</i>	41
1. Bonnes Pratiques de Fabrication - Partie IV	41
2. Bonnes Pratiques de Fabrication - Annexe 1.....	42
B. <i>Locaux BPF</i>	43
1. Conception.....	43

2.	Surveillance de l'environnement.....	45
II.	LES PROBLEMATIQUES DE LA PRODUCTION DE VIRUS.....	47
A.	<i>Généralités</i>	47
B.	<i>Etapas de production</i>	48
1.	Production non BPF	50
2.	Production BPF	51
C.	<i>Contraintes</i>	56
1.	Validation aseptique du procédé.....	56
2.	Qualification des locaux et équipements	58
	PARTIE III : CONCURRENCE.....	60
I.	REPLIMUNE.....	60
A.	<i>Virus de l'herpès</i>	61
B.	<i>Armement</i>	62
1.	RP1	62
2.	RP2 / RP3	65
C.	<i>Résultats cliniques</i>	66
1.	RP1	66
2.	RP2 / RP3	68
II.	CANDEL THERAPEUTICS	69
A.	<i>Adénovirus</i>	70
B.	<i>Armement et mécanisme d'action</i>	70
C.	<i>Résultats cliniques</i>	74
	ANNEXE 1	85

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation des différents mécanismes tumoraux de survie cellulaire	14
Figure 2 : Représentation des différentes cellules immunitaires (9).....	15
Figure 3 : Signaux transmis au LT-CD4 pour son activation	16
Figure 4 : Cycle cancer-immunité (12).....	17
Figure 5 : Mécanisme d'échappement immunitaire (9).....	19
Figure 6 : Interactions entre les LT, les CPA et les cellules cancéreuses permettant l'activation ou la régulation du LT (14).....	20
Figure 7 : Cibles des différentes classes des anticancéreux cytotoxiques	21
Figure 8 : Cible du 5-FU dans le cycle de synthèse de l'ADN.....	21
Figure 9 : Récapitulatif des différentes interactions récepteur-ligand entre une cellule cancéreuse, un LT et une CPA (19).....	23
Figure 10 : Etapes de préparation des CAR-T cells (21)	24
Figure 11 : Schéma simplifié des actions de RR et TK dans une cellule (30).....	28
Figure 12 : Réplication des virus TG6002 et BT-001 dans des hépatocytes et des cellules HepG2.	28
Figure 13 : Génome modifié du virus de la vaccine, souche Copenhague (31).	29
Figure 14 : Mécanisme d'action du virus BT-001	30
Figure 15 : Récapitulatif des sites d'action des différents armements de l'essai clinique BT-001	31
Figure 16 : Déroulement d'un essai clinique (37).....	32
Figure 17 : Activité antitumorale des VV (29)	34
Figure 18 : Schéma d'administration des produits en fonction des bras	35
Figure 19 : Schéma d'administration des produits.....	36
Figure 20 : Pourcentage de LTreg et de LT CD8 par rapport aux candidats testés	37
Figure 21 : Survie après traitement par BT-001 dans plusieurs modèles de tumeurs.....	37
Figure 22 : VVGM- α CTLA-4 IT en synergie avec PD-1 dans différents modèles tumoraux	39
Figure 23 : Exemple d'habillage pour classe C / D (48).....	45
Figure 24: Tableaux des conditions environnementales (particulaires et microbiologiques) recommandées par les BPF	46
Figure 25 : Etapes générales de fabrication d'un virus oncolytique	48
Figure 26 : Photo d'un PSM (à gauche) et schéma du flux d'air (à droite)	50
Figure 27 : Principe du système de transfert aseptique au niveau de la paroi de l'isolateur	52
Figure 28 : Démonstration du principe de la TFF (50).....	54
Figure 29 : Poste d'observation pour le mirage	56
Figure 30 : Portefeuille clinique de la société Replimune	60

Figure 31 : Virus HSV-1 sélectionné pour les candidats RPx de Replimune.....	62
Figure 32 : Effet de GALV-GP-R- dans un modèle tumoral immunocompétent.....	63
Figure 33 : Infiltration des LT CD8 et présence du ligand PD-L1 dans un modèle murin.....	64
Figure 34 : Courbe de croissance tumorale en fonction des virus injectés	66
Figure 35 : Schéma clinique du RP3 dans le carcinome épidermoïde de la tête et du cou.....	68
Figure 36 : Portefeuille clinique de la société Candela	69
Figure 37 : Mécanisme d'action de CAN-2409	71
Figure 38 : Effets cytotoxiques et induction de PD-L1 par CAN-2409 dans les lignées cellulaires de glioblastome	72
Figure 39 : Pourcentage de survie du modèle murin après injection de CAN-2409 +/- l'anticorps anti-PD-L1	72
Figure 40 : Expression des cytokines in vitro après traitement au CAN-2409 par rapport au contrôle	73
Figure 41 : Expression des gènes associés aux macrophages après traitement au CAN-2409.....	73

LISTE DES ABREVIATIONS

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
ATU : Autorisation Temporaire d'Utilisation
Bax : Bcl2-associated X
BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication
CAR : Chimeric Antigen Receptor
CD4 : cluster of differentiation 4
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA : Cellule présentatrice d'antigène
CPNPC : Cancer du poumon non à petites cellules
CTA : Centrales de Traitement d'Air
CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
DC : Cellule dendritique
DHFR : Dihydrofolate Réductase
DP : Drug Product
DS : Drug Substance
dTDP : DésoxyThymidine Diphosphate
dUDP : DésoxyUridine Diphosphate
GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
HEPA : Filtre à Air à Haute Efficacité
IT : Intratumoral
IV : intraveineuse
LB : Lymphocyte B
LT : Lymphocyte T
MFT : Media Fill Test
MPT : Media Process Test
MVA : Modified Virus Ankara
MVS : Master Virus Seed
NYVAC : New York Board of Health
PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns
PD-1 : Programmed cell Death protein 1
pMVS : pré-Master Virus Seed
PRR : Pattern Recognition Receptor
PSM : Poste de Sécurité Microbiologique
RABS : Restricted Access Barrier System
Ras : GTPase
RR : Ribonucleotide Reductase
TK : Thymidine Kinase (issue du gene *J2R*)
TS : Thymidylate Synthase
Ufp ou pfu : Unité formant plaque
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
v-Src : tyrosine kinase du sarcome de Rous
WVS : Working Virus Seed
VV : Virus de la Vaccine
5-FC : flucytosine
5-FU : 5-fluorouracile
5-FUMP : 5-fluorouridine-5'-monophosphate

INTRODUCTION

Le cancer a été pendant longtemps considéré comme une maladie incurable. Grâce aux progrès actuels, des traitements ont vu le jour permettant de guérir certains cancers ou du moins ralentir la progression. Cependant, le nombre de nouveaux cas de cancers détectés par an est toujours en hausse, principalement du fait que la population évolue continuellement et qui compte de plus en plus de personnes âgées. En France, le nombre de cancers estimés en 2023 est d'environ 432 000 cas avec une répartition de 245 000 chez les hommes et 187 000 chez la femme. Les cancers les plus fréquents sont ceux de la prostate, du sein, du côlon-rectum et du poumon. Néanmoins le nombre de décès par cancer est en baisse entre 2010 et 2018 grâce aux progrès de détection de la maladie mais également grâce aux nouveaux traitements (1).

Les thérapies actuellement disponibles sur le marché ont démontré leur efficacité. Qu'il s'agisse de la chimiothérapie, de l'hormonothérapie, de la radiothérapie ou encore des immunothérapies, elles ont apporté des résultats significatifs, bien que leur efficacité ne soit pas absolue. Cependant, de nouveaux candidats thérapeutiques sont en cours de développement afin de cibler de manière plus précise les tumeurs tout en réduisant les effets secondaires indésirables. Parmi les innovations émergentes, les immunothérapies oncolytiques arrivent comme une stratégie prometteuse et novatrice pour lutter contre cette maladie dévastatrice.

Transgene, entreprise de Biotechnologie basée à Illkirch, développe ce type d'immunothérapies en utilisant le virus de la vaccine (VV) comme vecteur. Elle possède deux plateformes différentes (2):

- Myvac® pour une thérapie individualisée, composée de deux produits : TG4001 et TG4050
- Invir.IO® basée sur trois virus oncolytiques : TG6002, BT-001 et TG6050

La présente étude portera sur cette dernière plateforme, se concentrant particulièrement sur les produits TG6002 et BT-001 qui se trouvent actuellement en phase I d'essais clinique avec déjà des premiers résultats communiqués. L'essai clinique de TG6050 ayant commencé en mai 2023 avec le traitement de son premier patient, les données recueillies ne sont pas encore suffisamment développées pour être présentés (3). Grâce à l'exploitation des caractéristiques uniques des virus et en les redirigeant de manière ciblée vers les cellules cancéreuses, la thérapie par virus oncolytiques offre un espoir de traitements plus efficaces et mieux tolérés.

Ce travail consacré à la conception de virus oncolytique va remettre en contexte les caractéristiques spécifiques des cellules cancéreuses ainsi que du système immunitaire. Une évaluation de l'état des lieux sur les traitements actuels et leurs limites, expliquant la nécessité de nouvelles approches pour aider les

patients permettra d'éclairer l'émergence de ce type de technologie. Concevoir de tel virus en les modifiant pour cibler les cellules cancéreuses représente à la fois un défi d'armement interne du virus et de mise en place d'une production à grande échelle. Les conditions de fabrication spécifiques à ce type de produit sont particulières et exigeante. Les étapes de production des virus développés par Transgene seront donc détaillées menant ensuite à la dernière section abordant la concurrence présente et stimulante utilisant d'autres souches virales et mécanisme d'action. Cette perspective permettra d'élargir notre compréhension des virus oncolytiques en développement, en offrant un aperçu plus complet du paysage de cette innovation prometteuse.

PARTIE I : Immunothérapie et virus oncolytique

I. Contexte

A. Cancer et réponses immunitaires

L'appellation du mot cancer vient du latin *cancer* signifiant « crabe ». Ce terme a été trouvée par Hippocrate qui a comparé la forme d'une tumeur (ronde qui s'étend en rayons) semblable à celle d'un crabe en mouvement (4). Cette maladie complexe est provoquée par le dérèglement de cellules qui prolifèrent de manière incontrôlée à la suite de mutations génétiques. Elles engendrent un réseau de cellules anormales pouvant provoquer des dysfonctionnements au niveau des organes où elles sont situées ou se propager à d'autres organes. Les facteurs de risque de cette maladie peuvent être nombreux et différent d'une personne a une autre (environnemental, génétique, hormonal, infectieux etc...) (1). Afin de mieux comprendre les mécanismes de défense et de survie d'un cancer, ses caractéristiques intrinsèques et son microenvironnement immunitaire vont être détaillés ainsi que les traitements existants et leurs limites.

1. Les caractéristiques du cancer

L'homéostasie tissulaire est un facteur important pour la survie cellulaire. Il se définit par la capacité des cellules à maintenir un équilibre afin d'assurer le fonctionnement et la structure du tissu cellulaire. Dans les cellules cancéreuses, le mécanisme d'homéostasie est perturbé, ce qui conduit à une perte de régulation des processus cellulaires tels que la division ou la différenciation cellulaire. En 2000 (5), le cancer fut défini par six caractéristiques fonctionnelles permettant sa survie.

- Son **indépendance par rapport aux facteurs de croissance** grâce à l'activation de récepteurs indépendants à des facteurs de croissance (tels que la voie des récepteurs à la tyrosine kinase) et l'activation autonome des voies de signalisation cellulaire (*v-Src*, régule l'adhérence et la migration des cellules et *Ras*).
- **L'échappement aux signaux antiprolifératifs**, qui se traduit par des pertes ou des mutations de gènes tel que *pRb*, protéine du rétinoblastome qui est à l'origine de nombreux signaux antiprolifératifs, ou *p53*, gène suppresseur de tumeur.
- **La mort cellulaire programmée (ou apoptose)** est un mécanisme naturel dans le cycle de vie cellulaire qu'une cellule tumorale réussit à esquiver. De nombreux signaux déclenchant l'apoptose convergent vers les mitochondries, qui répondent aux signaux pro-apoptotiques en libérant du cytochrome C, un puissant catalyseur de l'apoptose. La protéine suppresseur de tumeur *p53* peut déclencher l'apoptose en régulant à la hausse l'expression de Bax, en réponse à la détection de dommages à l'ADN. Bax stimule à son tour les mitochondries pour libérer le cytochrome C. Dans

- le cas de nombreux cancers, *p53* est muté et ne joue plus son rôle d'activateur de l'apoptose.
- Le quatrième point fonctionnel est **la réplication illimitée**. En effet, une cellule saine possède un certain nombre de réplification avant de passer dans un stade dit de sénescence. Ce stade peut être contourné par les cellules tumorales en désactivant leurs protéines suppresseurs de tumeur *pRb* et *p53*, mais aussi par surexpression de la télomérase capable de rallonger les télomères (6). L'inactivation de la protéine *p53* est observée dans plus de 50 % des cancers humains.
 - L'augmentation de la synthèse de vaisseaux sanguins par **angiogenèse** permet d'amener l'oxygène et les nutriments nécessaires à la survie des cellules. L'activation de l'oncogène *Ras* dans certains types de cellules entraîne une régulation positive de l'expression du VEGF, facteur de croissance clef de l'angiogenèse (7).
 - Pour finir, les complications tumorales sont surtout dues à une invasion tissulaire locale et à distance du site primaire. Aussi appelé **métastases**, elles sont la cause de 90 % des décès par cancer chez l'Homme.

Ces différents mécanismes tumoraux sont synthétisés dans Figure 1

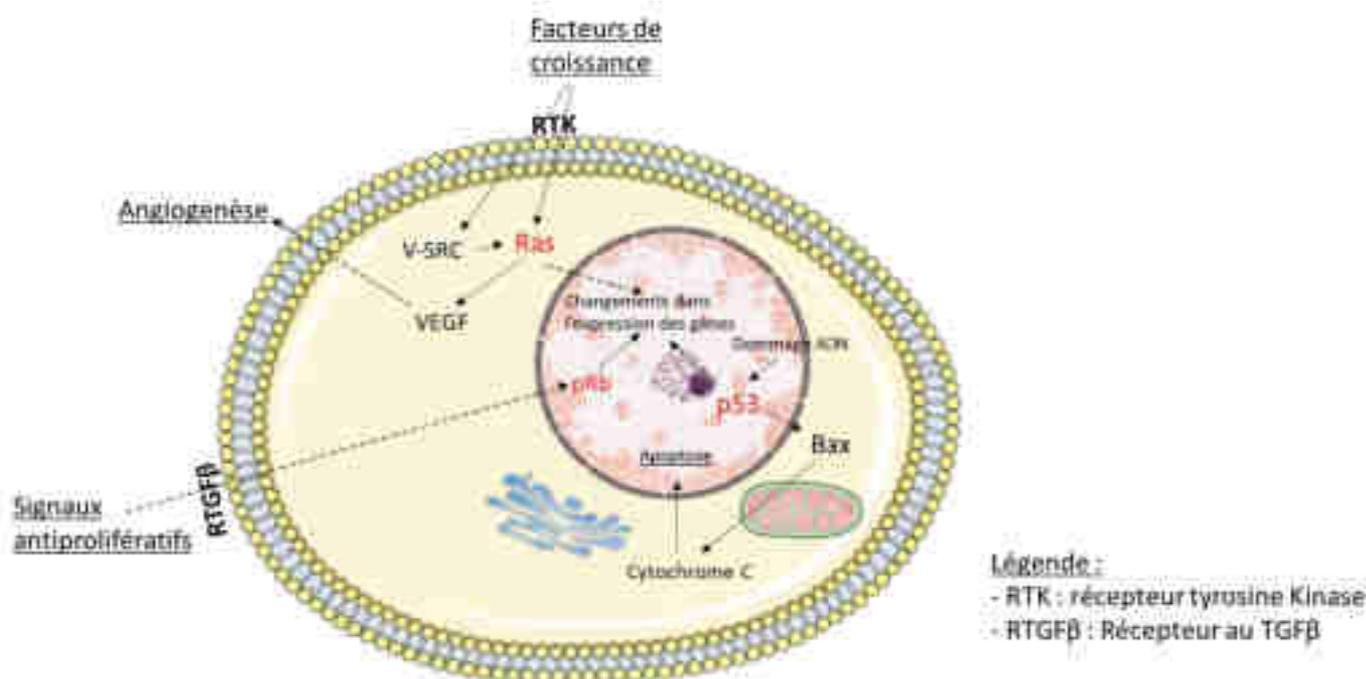


Figure 1 : Représentation des différents mécanismes tumoraux de survie cellulaire

L'acquisition de capacités biologiques telles que la résistance à l'apoptose, l'angiogenèse soutenue et le potentiel répliatif illimité peut apparaître à différents moments du processus tumoral.

Par la suite, de nouvelles caractéristiques ont été découvertes (8), parmi celles-ci, la **reprogrammation** du métabolisme énergétique ou encore **l'échappement à la destruction immunitaire**. Ce dernier point permet de faire le lien entre les cellules immunitaires et les cancers. En effet, le microenvironnement tumoral est très hétérogène et n'est pas seulement composé de cellules tumorales mais de cellules endothéliales, de fibroblastes, de cellules immunitaires... Appuyé par l'inflammation chronique et l'instabilité génétique, cela fait de l'environnement tumoral un microcosme indépendant.

Parmi toutes ces caractéristiques, certaines sont ciblées pour éliminer sélectivement les cellules tumorales. Par exemple, la réplication multiple et illimitée est favorable à la réplication de virus oncolytiques.

Afin de comprendre plus spécifiquement le lien entre cellules immunitaires, le cancer et par la suite les virus oncolytiques, la partie suivante va aborder les différents types d'immunité présent au sein du microenvironnement tumoral.

2. Réponses immunitaires

Le système immunitaire est composé de deux branches principales pour lutter contre les pathogènes (Figure 2).

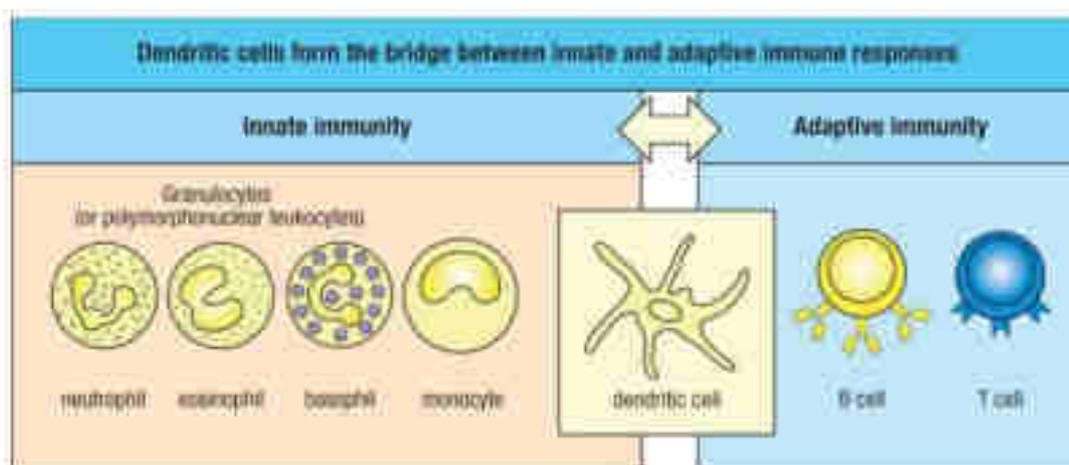


Figure 2 : Représentation des différentes cellules immunitaires (9)

La première ligne de défense correspond à l'immunité innée. Elle est composée principalement de cellules dendritiques (DC), granulocytes ou encore de macrophage. Cette réponse est induite lorsqu'un signal de danger est émis suite à l'interaction spécifique entre des récepteurs du soi appelés PRR (« Pattern Recognition Receptors ») et des molécules du non-soi appelées PAMP (« Pathogen Associated Molecular Patterns »). Ces cellules vont alors détruire le pathogène étranger.

Si cette première immunité n'est pas suffisante pour éliminer le pathogène, l'immunité adaptative prend ensuite le relais. Elle est principalement composée de lymphocytes qui font partie de deux familles : les lymphocytes B (LB), cellules sécrétrices d'anticorps et les lymphocytes T (LT). Pour mieux comprendre la suite de ce rapport, le développement des LT sera détaillé.

Les LT naissent dans la moelle osseuse et migrent dans le thymus pour devenir mature. Lors de leur entrée dans le thymus, les LT sont au stade dit « double négatif » c'est-à-dire qu'ils n'expriment aucune protéine de surface (CD4, CD8, CD3 et TCR). Après plusieurs sélections (positive et négative) pour éviter des lymphocytes auto-réactifs ou inefficaces, les LT vont se différencier par leur protéine de surface et devenir mature. Ces protéines permettent de classer les LT en différentes catégories :

- **LT- $\gamma\delta$** , qui expriment la protéine TCR-1 associé à CD3. Ces lymphocytes reconnaissent plusieurs types d'antigènes et n'ont pas besoin des cellules présentatrices d'antigène (CPA) pour

être activés.

- **Cellules NKT** (Natural Killer T) qui expriment la protéine TCR-2 associé à CD3. Elles peuvent produire de grandes quantités de cytokines pour réguler le système immunitaire et sont également douées d'une activité cytotoxique.
- **LT-CD8** qui expriment la protéine TCR-2 associé aux protéines CD3 et CD8 : ils deviendront des LT cytotoxiques et reconnaîtront le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) des CPA. Ce CMH-I est un système de reconnaissance du soi présent sur toutes les cellules nucléées de l'organisme.
- **LT-CD4** qui expriment un TCR-2 associé au CD3 et au CD4 : ils deviendront des LT helper qui jouent un rôle de régulation du système immunitaire adaptatif. Ils reconnaîtront le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) présent uniquement sur les CPA.

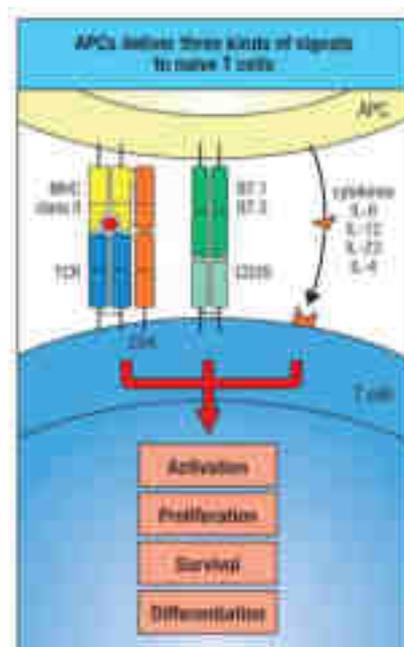


Figure 3 : Signaux transmis au LT-CD4 pour son activation

Une fois différenciés et matures, ils vont quitter le thymus et migrer en périphérie. Les LT-CD4 et CD8 doivent recevoir trois types de signaux par des CPA pour être activés. Le premier signal correspond à la liaison du complexe peptide étranger-CMH-II par le récepteur TCR et par un co-récepteur CD4 par exemple, comme décrit Figure 3. Le second signal de co-stimulation doit être délivré par la même CPA grâce à la rencontre du CD28 du LT sur la molécule B7 de la CPA. Cela a pour effet l'augmentation de la prolifération et de la survie de ce LT. Pour les LT-CD4 en particulier, différentes voies de différenciation produisent des sous-ensembles de LT effecteurs qui effectuent différentes réponses, en fonction de la nature d'un troisième signal délivré par la CPA. Les cytokines représentent généralement, mais pas exclusivement, le troisième signal impliqué dans la direction de cette différenciation (9).

Dans le cadre de l'immunité tumorale, les cellules de l'immunité innée participent à la lyse tumorale par la reconnaissance des PAMP à la surface de la cellule anormale. Elles vont également pouvoir présenter un antigène spécifique de ces cellules tumorales aux cellules de l'immunité adaptative par le biais de

leur CMH. Ces interactions permettent à l'organisme de lutter contre les cellules cancéreuses, mais cela a des limites.

i. Théorie du danger

La reconnaissance des pathogènes étrangers sans réaction des cellules immunitaires de notre propre corps a suscité de nombreux questionnements. Pendant longtemps, la théorie du « soi et du non soi » a permis de décrire les réactions immunitaires dirigées contre les éléments étrangers au corps. Par la suite, Paul Matzinger a proposé la « théorie du danger », expliquant que les réponses immunitaires sont déclenchées par des « signaux de danger » ou des « signaux d'alarme » émis par les propres cellules du corps. Toute réponse immunitaire n'est pas due à la présence de « non-soi » mais à l'émission, au sein de l'organisme, de signaux de danger dû à un dommage préalable, comme une cellule infectée par un virus par exemple. Ce principe permet d'expliquer la tolérance de l'organisme de certains éléments étrangers tels que les bactéries commensales de l'intestin, mais a tout de même des limites, en particulier concernant les tumeurs. Matzinger a affirmé que selon cette théorie, l'absence de réponse immunitaire au sein d'une tumeur est liée au fait qu'elle est composée de cellules saines en croissance. Or, ces dernières ne subissent pas la mort par nécrose ou n'envoient pas de signaux d'alarme. Mais il est su à présent qu'une réponse immunitaire existe envers les tumeurs et qu'elle en élimine beaucoup (10).

ii. Cycle cancer immunité

Dans les années 2010, un cycle « cancer-immunité » a été décrit, selon lequel les cellules cancéreuses devraient être éradiquées grâce à une réponse immunitaire acquise des LT. En effet, des protéines composant les cellules tumorales peuvent muter (on les appelle les « néo-antigènes » (11)) et être reconnues par le système immunitaire. Ce cycle se déroule en 7 phases, illustrées Figure 4.

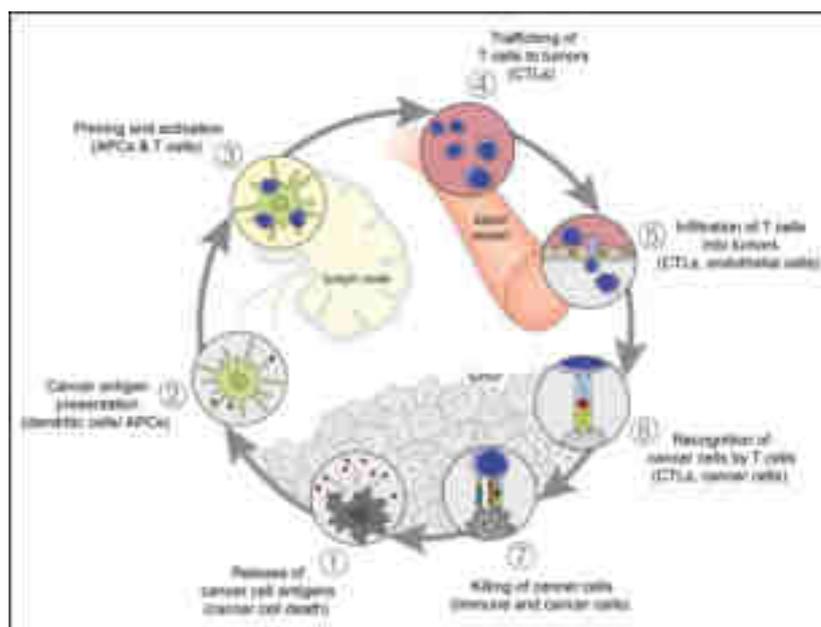


Figure 4 : Cycle cancer-immunité (12)

Tout d'abord, les néo-antigènes créés par l'oncogenèse sont libérés (étape 1) et capturés par les cellules dendritiques. Cette étape doit être accompagnée de signaux pour fonctionner tels que des cytokine pro-inflammatoires. Les DC présentent ensuite ces antigènes capturés aux LT via le CMH (étape 2), ce qui entraîne l'activation des LT effecteurs contre ces antigènes spécifiques du cancer (étape 3). La nature de la réponse immunitaire est déterminée à ce stade. En effet, il existe un équilibre critique entre le rapport des LT CD4 effecteurs et régulateurs qui joue un rôle déterminant dans le résultat final. Si trop de cellules régulatrices sont activés, les cellules effectrices seront trop fortement inhibées et ne pourront plus faire leurs actions. Enfin, les LT effecteurs activés circulent vers le lit tumoral (étape 4), l'infiltrant (étape 5) et se lient spécifiquement aux cellules cancéreuses par l'interaction entre son récepteur de cellule T (TCR) et son antigène apparenté lié au CMH (étape 6). Ils tuent alors les cellules cancéreuses (étape 7). Lorsque les cellules cancéreuses sont détruites, des antigènes supplémentaires associés à la tumeur sont libérés (retour à l'étape 1), augmentant l'ampleur et la profondeur de la réponse au prochain tour du cycle (12).

Ce cycle immunitaire du cancer est déséquilibré chez les patients dont le cancer se développe. Les néo antigènes tumoraux peuvent ne pas être détectés par les DC ou bien les LT peuvent considérer ces antigènes comme étant du soi plutôt qu'étranger. Cela amène à une réponse des LT régulateurs plutôt qu'effecteurs, ils ne peuvent pas infiltrer correctement la tumeur ou alors vont être supprimés par le microenvironnement tumoral. Ce système d'échappement immunitaire peut être obtenu par plusieurs mécanismes différents.

iii. Échappement immunitaire

Pour qu'un cancer devienne incontrôlable, il doit réussir à échapper au cycle décrit précédemment (Figure 5). Une tumeur va passer par trois phases d'évolution (9) :

- La phase d'élimination où le système immunitaire reconnaît et tue la tumeur,
- La phase d'équilibre avec l'acquisition de mutation. Il s'agit d'une adaptation de la tumeur,
- La phase d'échappement avec une prolifération incontrôlée, le système immunitaire est dépassé.

Cette phase d'échappement arrive grâce à divers mécanismes (Figure 5 : Mécanisme d'échappement immunitaire (9)). Par exemple, l'activation des LT médiés par les DC peut être empêchée par la tumeur qui ne présente aucun peptide tumoral à sa surface ou les antigènes présentés seront considérés comme du soi. Il existe également des mécanismes de suppressions immunitaires : même si les cellules T spécifiques de l'antigène tumoral infiltrant le tissu tumoral, leur activité tueuse de tumeurs peut être bloquée par des cellules régulatrices ou par activation des points de contrôle immunitaires, tels que PD-L1 (*ProgrammeDeath Ligand 1*) ou CD80 (9) (13).

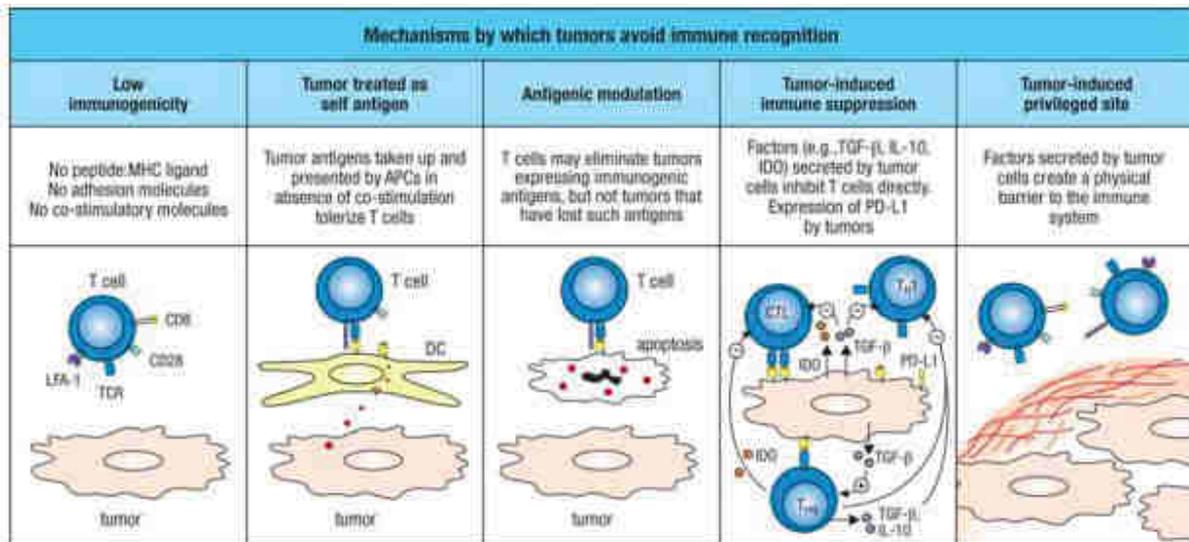


Figure 5 : Mécanisme d'échappement immunitaire (9)

Ces points de contrôles immunitaires jouent un rôle important au sein des tumeurs. En effet, les réponses immunitaires sont contrôlées par plusieurs points de contrôle immunologiques. Ils peuvent être positifs ou négatifs. Un point de contrôle positif est contrôlé par les récepteurs de costimulation, tel que le CD28. Après liaison à leurs ligands qui sont présentés par les CPA telles que les DC, ces récepteurs activateurs peuvent amener les signaux nécessaires à l'activation du LT.

Les points de contrôle immunologiques négatifs sont assurés par des récepteurs inhibiteurs tels que CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*) et PD-1 (*ProgrammeDeath Ligand 1*). CTLA-4 impose un point de contrôle critique pour les cellules T potentiellement autoréactives en se liant aux molécules CD80 (ou B7.1) sur les DC et en fournissant un signal négatif. Ce signal doit être surmonté par d'autres signaux positifs avant que les cellules T ne puissent être activées. Il en est de même pour le récepteur PD-1, exprimé à la surface des LT qui inhibe leur croissance (9).

Ces différents signaux permettent une régulation des lymphocytes afin d'éviter une expansion clonale incontrôlable. Dans certaines tumeurs, les cellules cancéreuses expriment le ligand PD-L1 à leur surface. Son expression est augmentée par l'interféron gamma, cytokine sécrétée par les LT. Cela permet aux cellules cancéreuses de se lier au récepteur PD-1 des LT et ainsi leur envoyer un message d'inhibition. Ces différentes interactions sont récapitulées Figure 6.

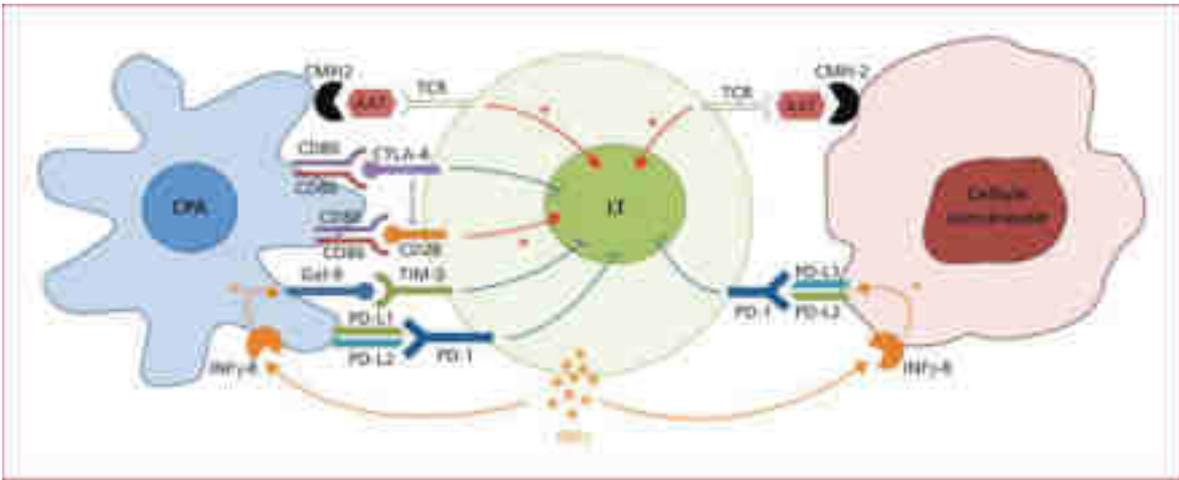


Figure 6 : Interactions entre les LT, les CPA et les cellules cancéreuses permettant l'activation ou la régulation du LT (14)

Les cellules cancéreuses et le système immunitaire sont donc des systèmes complexes mais ayant des particularités pouvant être ciblées afin d'éradiquer la tumeur. Des traitements existent depuis plusieurs années et de nouveaux émergent afin de cibler plus spécifiquement les tumeurs.

3. Traitements actuels

Comme chaque cancer est unique avec ses propres mutations, le traitement doit être adapté à chacun. Le choix du traitement est décidé lors d'une réunion de concertation pluridisciplinaire, par plusieurs professionnels de santé. Lorsque cela est possible, la chirurgie est privilégiée et souvent associée à une radiothérapie ou à une prise médicamenteuse (telles que la chimiothérapie, l'hormonothérapie, l'immunothérapie et les thérapies ciblées). Ces traitements ont pour objectifs de supprimer la tumeur ou les métastases, de réduire le risque de récurrence et de prévenir et traiter les symptômes engendrés pour assurer la meilleure qualité de vie possible (15).

i. La chimiothérapie

La chimiothérapie est née vers 1943 aux Etats-Unis et a pour objectif de détruire toutes les cellules en division. La classe des alkylants qui a vu le jour après la seconde guerre mondiale, reste encore très largement utilisé. Depuis, d'autres classes ciblant les cellules en division ont enrichi le panel de médicaments, tels que les antimétabolites, les inhibiteurs de topoisomérase ou encore les poisons du fuseau mitotique (Figure 7) (16).

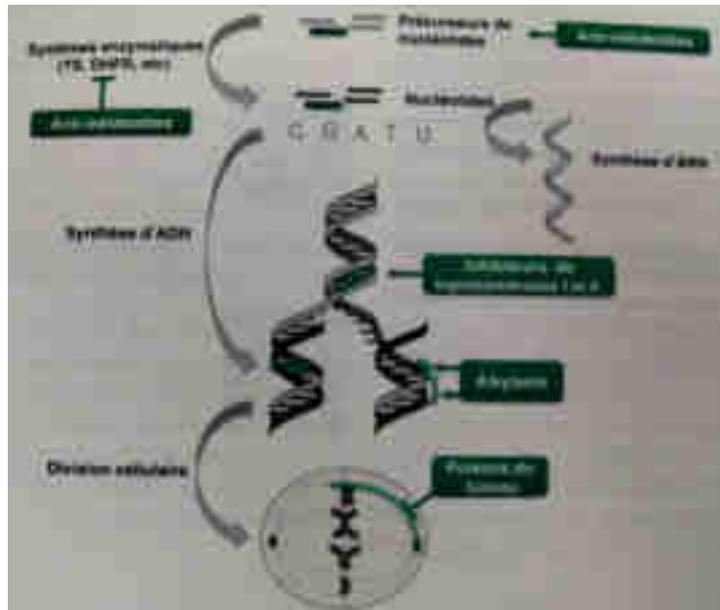


Figure 7 : Cibles des différentes classes des anticancéreux cytotoxiques

Par exemple, le 5-fluorouracile (5-FU) fait partie de la famille des antimétabolites, il va inhiber la synthèse des acides nucléiques de l'ADN et de l'ARN et en particulier les bases pyrimidiques. Il va interagir avec les enzymes du métabolisme des pyrimidines tel que la thymidylate synthase (TS), empêchant la synthèse du désoxyuracile diphosphate (dUDP) en désoxythymidine diphosphate (dTDP) ainsi que sa transformation en dihydrofolate réductase (DHFR) ce qui rend la synthèse de base impossible. Ce mécanisme est détaillé Figure 8 (16).

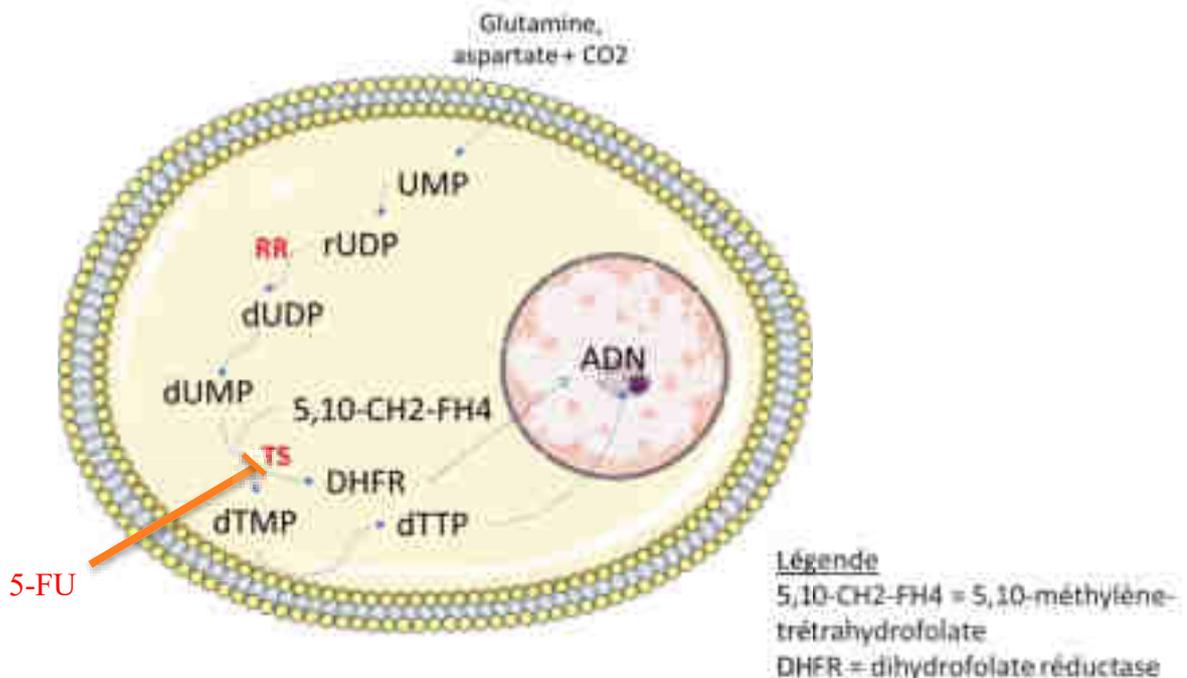


Figure 8 : Cible du 5-FU dans le cycle de synthèse de l'ADN

Le principal inconvénient de ces composés cytotoxiques est leur manque de sélectivité : ils ciblent à la fois les cellules tumorales mais également les cellules saines. Les effets indésirables sont donc très fréquents et potentiellement graves comme des toxicités digestives ou hématologiques, des alopecies...

ii. Les thérapies ciblées

A la fin du XX^{ème} siècle, le développement de la biologie moléculaire a permis d'améliorer la connaissance des nouvelles cibles thérapeutiques comme des antigènes de surface ou des facteurs de régulation de l'immunité antitumorale. On distingue deux stratégies principales :

- Un ciblage extracellulaire par la reconnaissance d'un antigène de surface ou par blocage d'un récepteur. Ce ciblage se fait par un anticorps monoclonal qui se fixe sur la cible.
- Un ciblage intracellulaire par blocage compétitif d'un site ATP-dépendant grâce à une petite molécule. Cette activité peut être portée par un récepteur membranaire (VEGFR pour l'angiogenèse) ou par une protéine intracellulaire (B-Raf qui amène la cellule dans un état de prolifération incontrôlée si la protéine est mutée). La molécule s'y fixe pour bloquer l'activité anormale.

Ces médicaments ont donc été développés pour cibler directement les cellules cancéreuses ou le microenvironnement tumoral. Bien que leurs actions soient plus ciblées que la chimiothérapie, les effets secondaires sont tout de même présents. On retrouve des troubles digestifs, une asthénie, des réactions cutanées ou encore des réactions d'hypersensibilité. Il faut aussi faire très attention en prenant ces médicaments car il existe de nombreuses interactions médicamenteuses qui ne sont pas anodines (risque thrombo-embolique, risque cardiaque, modification du métabolisme hépatique...)(16).

De nouvelles approches sont donc en cours et ciblent préférentiellement le système immunitaire. En effet, un échappement au système immunitaire par les cellules cancéreuses peut avoir lieu. Des anticorps monoclonaux ont été développés pour réactiver le système immunitaire, on parle **d'immunothérapie anticancéreuse**. L'immunothérapie est en plein essor avec de nombreux candidats médicaments en développement. Cette approche permet un ciblage précis de la tumeur en limitant les effets secondaires rencontrés lors de l'utilisation de chimiothérapies et de thérapies ciblées, même s'ils sont moindres avec ces dernières.

B. Immunothérapie anticancéreuse

L'immunothérapie anticancéreuse est donc un principe thérapeutique qui consiste à stimuler le système immunitaire d'un patient pour qu'il s'attaque aux cellules tumorales. Il existe plusieurs approches d'immunothérapie.

1. Les anticorps monoclonaux.

Les anticorps monoclonaux sont fabriqués spécifiquement pour traiter une maladie. Après sélection d'un clone cellulaire d'un LB qui a appris à reconnaître une protéine cible, des anticorps sont produits. Si on expose ces cellules immunitaires à une protéine nécessaire à la réplication de cellules cancéreuses (récepteur, cytokine), l'anticorps obtenu va se fixer sur cette cible et l'empêcher de remplir son rôle. Les

cellules cancéreuses ne pourront donc plus se multiplier. Avec les anticorps monoclonaux, on peut ainsi neutraliser de manière très précise une protéine sans affecter les autres. Parmi ces anticorps, les inhibiteurs de points de contrôle immunitaire (ou inhibiteurs de checkpoint immunitaire) sont les plus utilisés.

Ces inhibiteurs de points de contrôle immunitaire ont été mis en évidence par James Allison et Tasuku Honjo qui ont reçu le prix Nobel de Physiologie ou Médecine en 2018 (17). Ils travaillaient respectivement sur les anticorps anti-CTLA4 (*Ipilimumab*) et anti-PD1 (*Nivolumab*, *Pembrolizumab*) qui ont maintenant une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) et sont administrés à des patients atteints de cancer. Ces anticorps sont des régulateurs négatifs de la fonction immunitaire des LT (18). Comme décrit précédemment, les LT peuvent être inactivés par différents types de ligands, présents à la surface des CPA ou des cellules cancéreuses. Pour éviter cette interaction récepteur-ligand, ces anticorps vont venir se fixer soit au niveau du récepteur (pour exemple anti-PD1), soit au niveau du ligand (anti PD-L1). Les différentes interactions sont détaillées Figure 9.

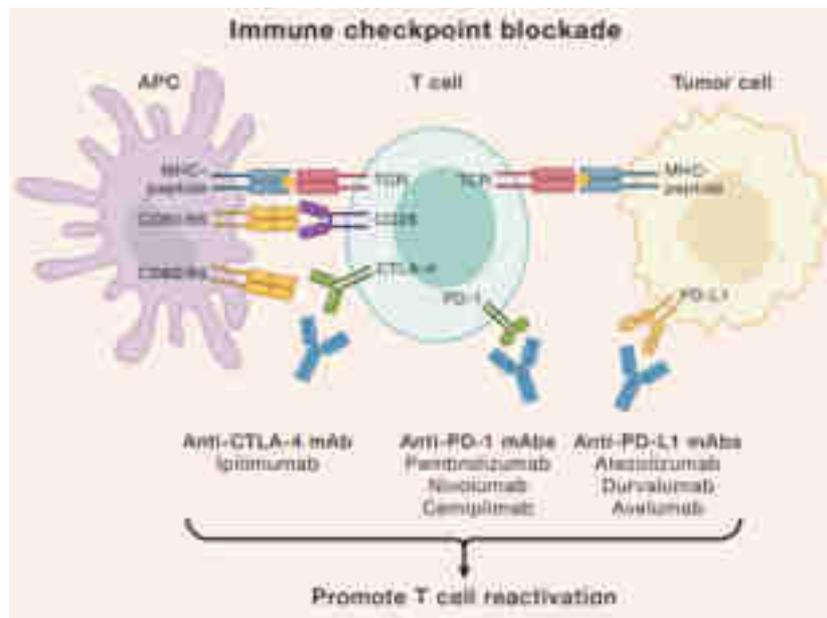


Figure 9 : Récapitulatif des différentes interactions récepteur-ligand entre une cellule cancéreuse, un LT et une CPA (19)

Ces points de contrôle immunitaire ont prouvé leur efficacité dans certains cancers, comme le mélanome, le cancer du poumon non à petites cellules ou encore le cancer de l'ovaire. Mais malgré leur efficacité, de nombreux patients ne bénéficient pas de ce traitement avancé pour trois raisons majeures. Premièrement, de nombreux cancers n'ont pas une forte immunogénicité. Deuxièmement, tous les patients atteints de tumeurs immunogènes ne répondent pas au traitement, en raison de mécanismes intrinsèques et extrinsèques aux cellules tumorales. Enfin, une résistance acquise apparaît chez certains patients (13). En effet, ces résistances peuvent venir de la perte de la fonction des LT, le manque de reconnaissance des LT par une régulation négative de la présentation de l'antigène tumoral ou par le

développement de variants de mutation d'échappement dans le cancer (20). Une solution serait de combiner plusieurs inhibiteurs de points de contrôle immunitaire mais cela augmente également les effets indésirables comme des complications cutanéomuqueuse ou digestive. D'autres approches doivent donc encore être développées pour améliorer ou remplacer ces inhibiteurs de points de contrôle immunitaire.

2. Les cellules CAR-T

En 1989, les premiers CAR (*chimeric antigen receptor*) ont été conçus par Z. Eshhar. Il les avait alors appelés *T-bodies*. Mais leur toxicité sévère a été révélée lors des études précliniques réalisées dès 1990. En 2003, des essais menés *in vitro* et *in vivo* ont en revanche montré le puissant potentiel thérapeutique de CAR anti-CD19. Le principe de ces cellules CAR-T est l'utilisation des LT modifiés génétiquement à l'aide de vecteurs viraux (lentivirus par exemple) ou non viraux (électroporation) codant la molécule complète du CAR considéré. Les CAR anti-CD19 sont les premiers à avoir été utilisés avec succès pour traiter une leucémie aiguë lymphoblastique. Ce sont des cellules qui expriment à leur surface des récepteurs chimériques résultant d'une partie scFv dérivé d'un anticorps anti-CD19 de forte affinité. Les différents CAR-T sont actuellement utilisés pour traiter les hémopathies malignes. La construction de ces lymphocytes suit des étapes particulières décrite Figure 10.

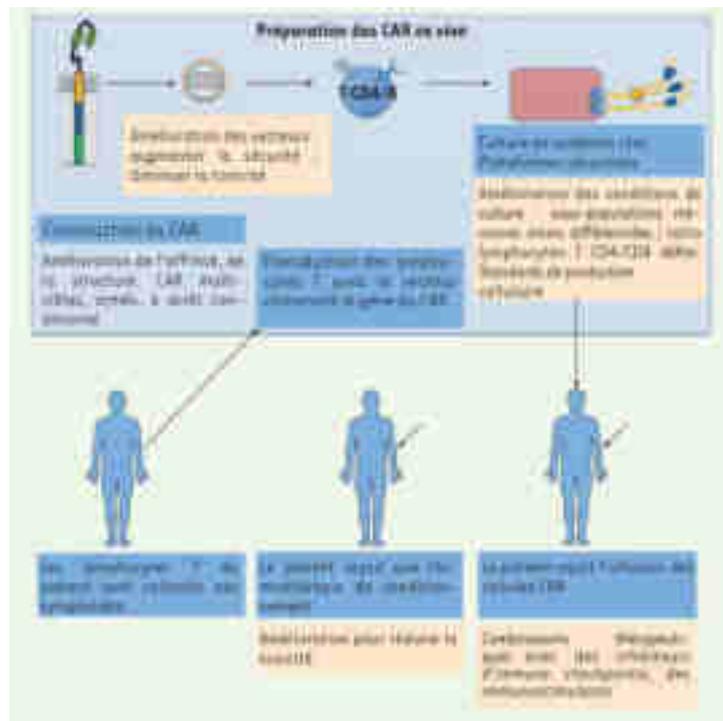


Figure 10 : Etapes de préparation des CAR-T cells (21)

Les LT du patient sont isolés par cytophérèse, une méthode de tri spécifique des cellules sanguines. Ils sont ensuite transduits avec les gènes cibles à l'aide de vecteur viraux ou non puis réinjectés au patient

par voie intraveineuse. Au préalable, le patient aura reçu une chimiothérapie de conditionnement pour améliorer l'efficacité des CAR-T.

En 2017, la FDA a approuvé l'utilisation des CAR-T cells avant même la fin de l'essai clinique prévu en 2024 à la suite de la rémission exceptionnelle des patients. En France, l'utilisation des CAR-T cells est sous autorisation temporaire d'utilisation (ATU) pour certains cancers sanguins.

Mais ces LT modifiés peuvent aussi induire des effets indésirables graves, engageant le pronostic vital. En effet, lorsque les CAR-T reconnaissent leur cible, ils libèrent de nombreuses cytokines inflammatoires, recrutent des cellules immunitaires, qui amplifient à leur tour la réaction inflammatoire. L'orage cytokinique peut être provoqué par la reconnaissance de faibles niveaux d'antigènes présents dans d'autres tissus que la tumeur. La toxicité est dite « on target ». Il peut également provenir de la reconnaissance de structures présentant un mimétisme antigénique avec l'antigène tumoral : la toxicité est alors dite « off target ». L'amélioration de cette technique est toujours en cours avec par exemple, le développement des multi-CAR, des CAR spécifiques de plusieurs cibles avec une combinaison aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaires. Cela ouvre une nouvelle ère pour l'immunothérapie des tumeurs. (21)

D'autres mécanismes d'action que l'utilisation des anticorps sont également en cours de développement, comme l'utilisation de virus présentant des antigènes spécifiques de la tumeur à sa surface ou encore de virus ciblant préférentiellement les cellules en répllication. Ces approches permettent de lyser les cellules tumorales mais aussi d'entraîner le système immunitaire à reconnaître la tumeur, sans modification de ce dernier.

3. L'immunothérapie oncolytique

L'immunothérapie oncolytique repose sur l'utilisation de virus qui se répliquent sélectivement dans les cellules tumorales. Au cours de l'évolution tumorale, les cellules ayant subi des mutations vont proliférer anarchiquement tout en échappant au système immunitaire. Elles vont donc se multiplier en excès mais cela va favoriser la répllication virale. L'immunothérapie oncolytique utilise donc ces modifications cellulaires acquises par la tumeur qui contribuent à une infection virale idéale. La lyse de ces cellules va aussi stimuler la réponse immunitaire antitumorale du patient. (22)

Les premières injections de pathogènes pour traiter le cancer ont été réalisées en 1891 par William B. Coley. Il a étudié des patients atteints de tumeur, chez qui la bactérie *Streptococcus pyogenes* avait été injectée. Il a mis en évidence que l'infection bactérienne stimule le système immunitaire retardant le développement du cancer. Il sera surnommé le « Père de l'immunothérapie » grâce à ses travaux. Il va injecter à plus de 1000 patients atteints de cancer des sarcomes et des tissus mous, des bactéries ou des lysats bactériens qui seront appelés « Coley's toxins ». Malgré de bons résultats avec 50% de rémission,

cette toxine a eu de nombreuses critiques. Sa production sera arrêtée en 1952 et en 1962 la FDA refusera de reconnaître la toxine comme un médicament. Willam B. Coley aura permis de démontrer l'efficacité du système immunitaire dans le traitement du cancer grâce à l'injection de pathogène (23). Dans la même période, l'observation des premiers virus oncolytiques a eu lieu et sera détaillée dans la partie suivante.

II. Virus oncolytiques

Les premières observations des virus oncolytiques datent de 1904 à la suite de la rémission d'une patiente atteinte de leucémie myéloïde chronique après avoir été infecté par la grippe. Mais il n'était pas encore connu à cette époque que la grippe était provoquée par un virus. Plusieurs observations similaires sont décrites par la suite jusqu'à une publication de 1974 qui constate un taux de rémission de près de 90 % dans une cohorte de 90 patients atteints de cancer en phase terminale et traités avec le virus des oreillons. Malgré ce résultat impressionnant, les travaux étudiant les virus ont été abandonnés en raison d'effets secondaires non négligeables. Il faudra attendre la fin des années 1990 pour assister à la résurgence des virus dits oncolytiques. Parmi les virus oncolytiques les plus étudiés actuellement figurent le virus de l'herpès simplex 1 (HSV-1), le VV qui va être décrit dans cette partie et l'adénovirus (24). Ces virus ont la particularité de cibler sélectivement les cellules tumorales mais également de stimuler l'immunité antitumorale, malgré l'échappement immunitaire.

A. Description du virus de la vaccine

Le VV fait partie de la famille des *Poxviridae* et du genre *Orthopoxvirus*. C'est un virus à ADN double brin linéaire d'environ 190 kb, qui code pour environ 200 gènes. La particule virale est enveloppée avec une forme ovoïde, d'une taille moyenne de 270 nm de largeur et 350 nm de longueur. Le génome des poxvirus a la particularité d'être cytoplasmique. Les gènes des poxvirus sont ainsi transcrits dans le cytoplasme grâce à des protéines virales présente dans les virions. De plus, ces virus ont un cycle de réplication rapide, en 12 h, environ 10 000 copies du génome seront fabriquées (25).

Le virus de la vaccine a été décrit pour la première fois au X^{ème} siècle par un scientifique perse. Par la suite, une variolisation naturelle a été mise en place en Europe. Cela consistait à mettre des individus sains en contact des sujets atteints d'une forme bénigne de la variole pour les immuniser. Plus tard, la variolisation par inoculation s'est répandue. C'est en 1796 qu'Edward Jenner découvrit que la vaccine, maladie des bovins, pouvait également se transmettre à l'Homme sous une forme bénigne et cette infection pouvait également protéger les personnes de la variole. Il testa alors cette théorie en inoculant un jeune garçon de huit ans avec le contenu de vésicules d'une fermière contaminée par la vaccine, puis l'inocula par la technique de la variolisation. Le garçon n'a présenté aucun signe d'infection. Le premier vaccin vient d'être créé (26).

Dû à sa faible pathogénicité, le VV est le Poxvirus le plus étudié. Grâce à différentes techniques d'atténuation, un grand nombre de souches atténuées de VV ont été produites, permettant de les utiliser comme vaccin, comme vecteur en laboratoire ou encore comme immunothérapie. Cela a donné lieu aux principales souches utilisées en oncologie comme par exemple la souche Copenhague, le Modified Virus Ankara (MVA) ou encore le New York Board of Health (NYVAC).

Le MVA a été généré en Allemagne en 1960 grâce à 570 passages successifs sur une culture cellulaire d'embryons de poulet. Ces passages ont permis la perte de nombreux gènes impliqués dans les réponses immunitaires, ce qui a permis au MVA de perdre sa capacité à produire un virus de descendance infectieuse dans presque toutes les lignées de cellules de mammifère, dont les cellules humaines (27). Cette souche est utilisée encore aujourd'hui avec la production du vaccin contre la variole du singe, ou encore les vaccins thérapeutiques personnalisés contre le cancer comme le produit TG4050 de Transgene.

La souche NYVAC quant à elle est un clone délété de 18 gènes immunomodulateurs. Ces modifications ont permis une réduction de la capacité du virus à se répliquer dans les cellules saines tout en gardant une bonne capacité d'induction immunitaire. Grâce à ces techniques de délétion, l'insertion des gènes d'intérêt dans le génome du virus est alors possible lorsqu'il est utilisé comme vecteur (28).

Pour comprendre ce qu'apporte ces souches dérivées du VV dans le traitement du cancer, deux virus présents sur la plateforme Invir.IO® de Transgene vont être présentés : BT-001 et TG6002. Ce sont tous les deux des VV dérivés de la souche Copenhague.

Afin d'optimiser la répllication sélective dans les cellules tumorales de ces deux virus, des délétions au niveau du génome ont été réalisées. Le gène *J2R* et *I4L* codent respectivement pour la thymidine kinase (TK) et pour la ribonucléotide réductase (RR). Ce sont des protéines nécessaires dans l'implication de la synthèse nucléotidique et la réparation de l'ADN qui ont été délétes de ces souches virales. En effet, les souches délétes de TK dépendent du pool cellulaire de thymidine triphosphate (dTTP) pour assurer leur propre synthèse d'ADN viral et donc de l'expression de la TK cellulaire. La délétion TK maintient le ciblage tumoral tout en affichant une capacité réduite à se répliquer dans d'autres tissus. La RR est une enzyme qui catalyse la conversion du ribonucléotide diphosphate (rNDP) en désoxynucléotide diphosphate (dNDP) qui est ensuite phosphorylé en désoxynucléotide triphosphate (dNTP). Ce dernier est un substrat direct des ADN polymérases et joue donc un rôle central dans la synthèse *de novo* de l'ADN pendant la répllication cellulaire, la réparation de l'ADN et la croissance cellulaire (Figure 11). La prolifération des cellules cancéreuses nécessite un excès de dNTP pour la synthèse de l'ADN. Par conséquent, l'expression élevée de RR est une caractéristique de nombreuses cellules cancéreuses primaires et métastatiques (29).

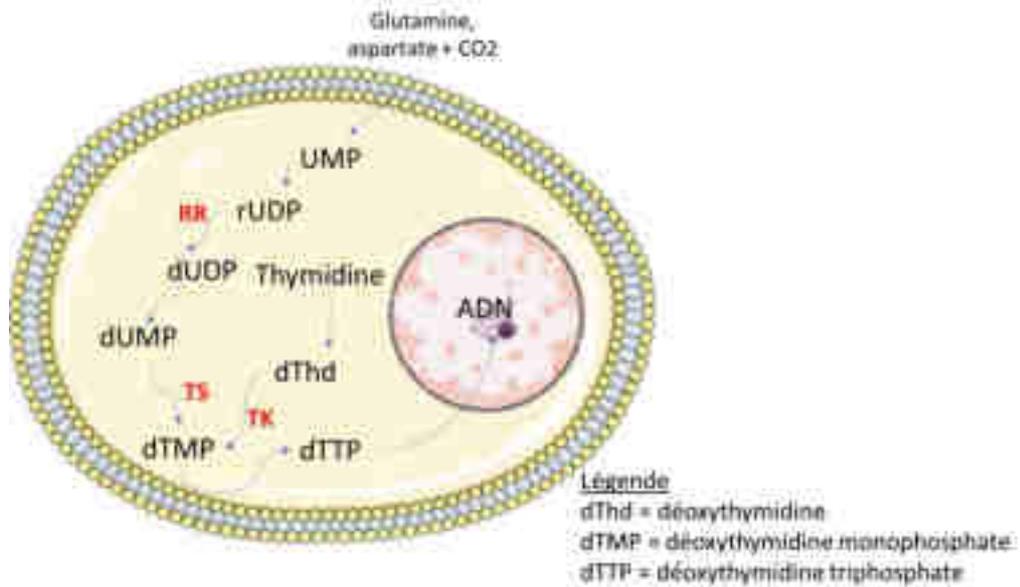


Figure 11 : Schéma simplifié des actions de RR et TK dans une cellule (30)

Ces deux délétions limitent donc la réplication du virus aux seules cellules hautement prolifératives (c'est-à-dire les cellules contenant des concentrations élevées de nucléotides) telles que les cellules tumorales. Les deux virus ont ensuite été armés spécifiquement avec des transgènes pour augmenter l'effet antitumoral.

La figure ci-dessous démontre la réplication sélective dans des cellules tumorales, ici HepG2 qui est une lignée cellulaire de cancer de foie humain comparée à des hépatocytes sains. On remarque bien sur la Figure 12 un taux de réplication supérieur dans les cellules tumorales que dans les cellules saines pour BT-001 et TG6002 comparé au virus « wild type ». (31)

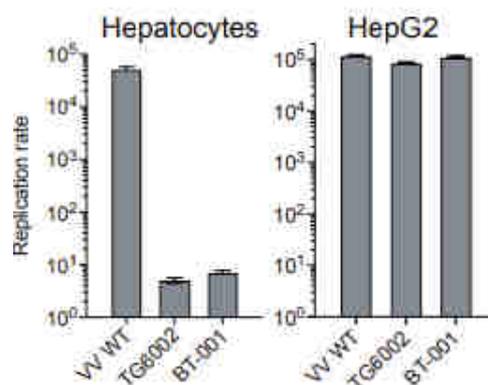


Figure 12 : Réplication des virus TG6002 et BT-001 dans des hépatocytes et des cellules HepG2

B. TG6002

1. Modifications réalisées

Ce virus, à l'origine de la plateforme Invir.IO®, intègre dans son ADN le gène suicide FCU1. Il code pour une protéine de fusion bifonctionnelle et catalyse efficacement la conversion directe de la

flucytosine (5-FC), un agent antifongique non toxique, en métabolites toxiques 5-fluorouracile (5FU) et 5-fluorouridine-5'-monophosphate (5-FUMP). Ce dernier va permettre l'inhibition de la synthèse d'ADN et de protéines. Ce mécanisme contourne ainsi la résistance naturelle de certaines cellules tumorales humaines au 5-FU (32) par l'augmentation du niveau de la TS pour compenser l'inhibition induite par le 5-FU (33). Cela permet d'éviter les effets secondaires pouvant être très néfastes du 5-FU comme décrit dans le Chapitre A.3.

2. Mécanisme d'action

TG6002 est indiqué dans les cancers colorectaux et est injecté soit en IV soit par voie intra-artérielle hépatique. Le virus va alors circuler dans la circulation sanguine jusqu'à trouver les cellules tumorales dans lesquels il va s'y répliquer préférentiellement. En parallèle, du 5-FC est administré par voie orale et va pouvoir être converti en 5-FU au niveau de la tumeur par l'expression du FCU1. Le 5-FU alors synthétisé va permettre de jouer son rôle cytotoxique au sein de la tumeur et tuer les cellules cancéreuses. Il a également été démontré un effet « bystander », c'est-à-dire une activité dans les cellules à proximité qui est intéressante dans le cas de métastases.

L'administration de ce virus a donc une double efficacité, d'une part par l'oncolyse directe par le virus, et d'autre part par la cytotoxicité du 5-FU synthétisé au sein de la tumeur.

C. BT-001

1. Modifications réalisées

Deux armements ont été rajoutés à l'ADN du virus BT-001 (ou VV_{GM-αCTLA4}) : un anticorps anti-CTLA4 développé par BioInvent ainsi que la cytokine GM-CSF. Ils ont été ajoutés au niveau des délétions de TK et RR.

L'anticorps anti-CTLA4 est un inhibiteur de point de contrôle immunitaire empêchant l'inhibition des LT antitumoraux et le GM-CSF est un facteur de croissance qui permet d'activer la réponse immunitaire. Le virus est injecté en intra tumorale, il permet donc d'avoir un effet local sans les effets secondaires systémiques de l'anticorps et de la cytokine.



Figure 13 : Génome modifié du virus de la vaccine, souche Copenhague (31)

2. Mécanisme d'action

BT-001 est directement injecté au niveau de la tumeur, et, par ses multiples délétions, se multiplie préférentiellement dans les cellules cancéreuses. Il entraîne ainsi leur destruction ciblée par oncolyse et génère une production locale de ses deux armements thérapeutiques. En effet, le virus va entrer dans les cellules par fusion avec la membrane de la cellule hôte et va engager la machinerie cellulaire cytoplasmique de cette cellule. Il va alors produire les protéines nécessaires à la création de l'anticorps anti-CTLA4 ainsi que la production du facteur de croissance GM-CSF. Par ses propriétés fondamentales, le virus va se répliquer libérant ainsi des virions par la mort cellulaire. Cette réplication virale va également permettre une activation du système immunitaire innée en provoquant la mort cellulaire de manière immunogène. Les CPA vont alors s'activer et vont présenter les antigènes associés à la tumeur aux cellules de l'immunité adaptative dirigées contre les cellules cancéreuses.

Associer des immunothérapies à ce mécanisme d'action est particulièrement prometteur en raison des interactions synergiques entre le virus oncolytique qui initie une réponse immunitaire et les molécules produites qui vont venir renforcer cette réponse.

BT-001 va donc avoir trois activités reconnues sur les cellules tumorales :

- L'oncolyse directe des cellules tumorales
- Le déclenchement d'une réponse immunitaire contre les cellules tumorales
- La déstabilisation du système vasculaire associé à la tumeur due à la destruction des cellules endothéliales à proximité de la tumeur (34)

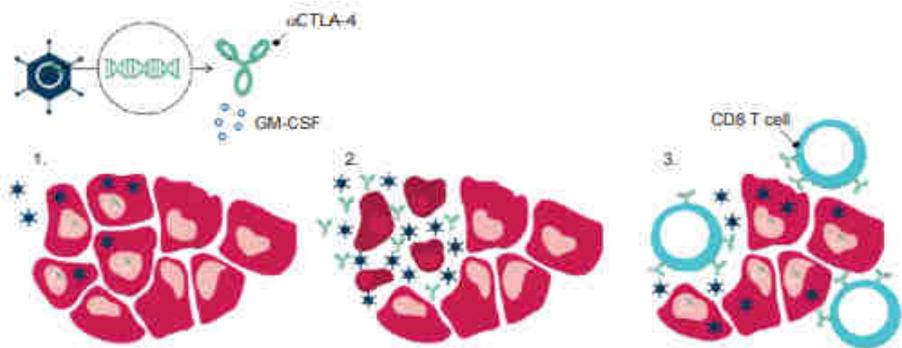


Figure 14 : Mécanisme d'action du virus BT-001

Les différents mécanismes sont détaillés ci-dessous :

- L'anticorps anti-CTLA4 ainsi produit dans la tumeur va neutraliser les cellules T régulatrices inhibitrices du système immunitaire ce qui va permettre d'activer les défenses immunitaires au sein de la tumeur. Comme expliqué dans le chapitre B.1, l'anticorps se fixe sur le récepteur CTLA4 des LT régulateurs empêchant son action de régulation des LT CD8. Ces derniers vont pouvoir alors jouer leur rôle de régulation.
- Le facteur de croissance GM-CSF est principalement exprimé par les DC ainsi que par les

monocytes et les macrophages. La production de GM-CSF est réalisée par ces cellules lors de simulation par des cytokines ou lors de la présentation d'un agent pathogène. Ce facteur de croissance est aussi très présent sur les sites inflammatoires des tissus. Cela le rend intéressant car l'inflammation permet d'attirer des cellules immunitaires mais aussi de libérer des cytokines qui vont causer des lésions tissulaires. Il a également été utilisé dans des vaccins antitumoraux contenant des antigènes spécifiques et du GM-CSF (35). L'idée est d'activer les macrophages et les DC qui traiteraient les antigènes injectés pour les présenter aux LT. Il a été démontré que l'utilisation seule du GM-CSF n'était pas assez efficace, mais l'était beaucoup plus en association avec des inhibiteurs de point de contrôle comme l'*Ipilimumab* (anti CTLA4) ou le *Pembrolizumab* (anti PD-1) (36). Ce dernier est d'ailleurs également utilisé en association avec le virus BT-001.

- *Pembrolizumab* (KEYTRUDA®) est injecté en IV après l'injection intra-tumoral de BT-001. Le *Pembrolizumab* est un anticorps anti PD-1 qui se fixe sur le récepteur de la cellule tumorale, empêchant la liaison avec le PD-L1 des lymphocytes. Cela empêche leur inhibition et peuvent continuer leur rôle de régulation.

La combinaison de ces 3 mécanismes résumé Figure 15, permet donc de multiples actions sur le système immunitaire pour tuer efficacement les cellules tumorales.

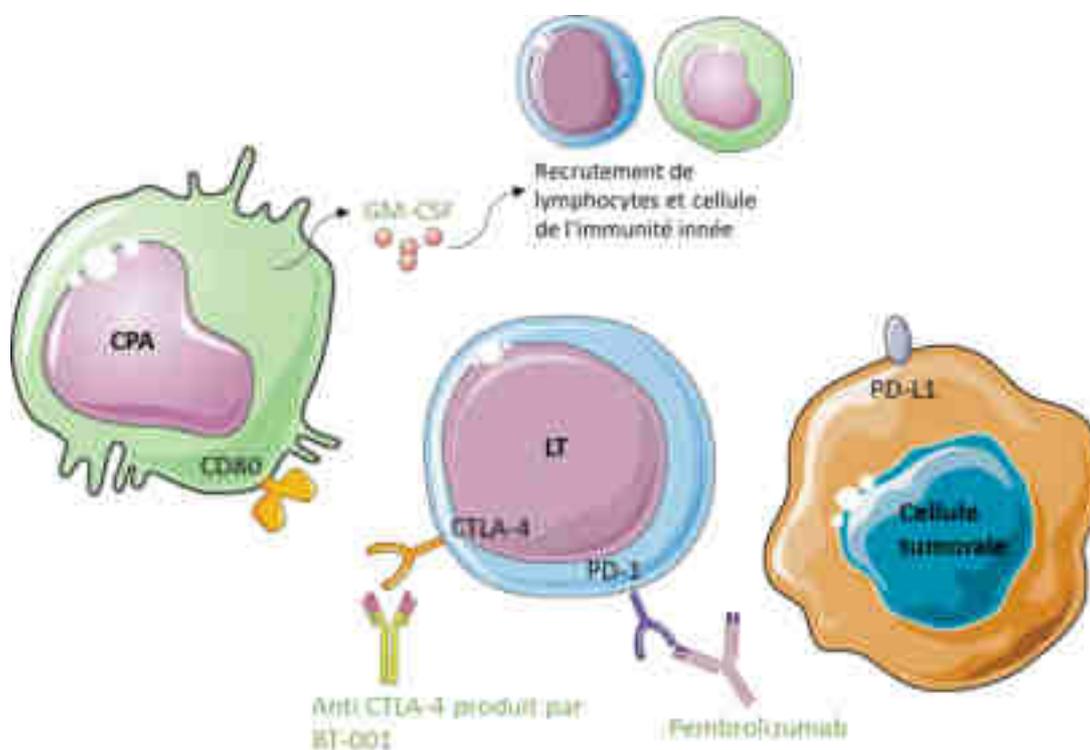


Figure 15 : Récapitulatif des sites d'action des différents armements de l'essai clinique BT-001

III. Résultats essais précliniques et cliniques

A. Déroulement d'une étude clinique

Lorsqu'un candidat médicament voit le jour en recherche, il doit passer par plusieurs étapes d'essais avant d'arriver sur le marché. Ces essais cliniques permettent d'évaluer la sécurité et l'efficacité du potentiel futur médicament avant l'obtention d'une AMM. Pour cela, des tests seront réalisés chez des volontaires sains ou malades. Après des études pré-cliniques sur des animaux, le candidat médicament va passer par quatre phases distinctes résumées dans la Figure 16.



Figure 16 : Déroulement d'un essai clinique (37)

Phase I : Cette étape implique l'administration de la molécule à un petit groupe de volontaires, qu'ils soient en bonne santé ou malades, en fonction de la molécule étudiée. L'objectif principal de cette phase est d'observer comment la molécule est métabolisée dans l'organisme et d'évaluer toute toxicité potentielle.

Phase II : Dans cette phase, un groupe plus important de volontaires malades est impliqué. L'objectif ici est de déterminer à quel point la molécule est tolérée par les patients et d'évaluer son efficacité. Au cours de cette étape, l'objectif est également de trouver la dose minimale efficace qui ne provoque pas d'effets indésirables significatifs.

Phase III : Cette phase implique un plus grand nombre de patients, généralement entre 100 et plus de 1000. L'objectif principal est d'évaluer l'efficacité du médicament à des fins thérapeutiques. Les patients sont souvent répartis en différents groupes pour comparer l'efficacité du traitement soit par rapport à une référence, soit par rapport à un placebo.

A l'issue de la phase III, les autorités de santé délivrent une AMM si le médicament testé a obtenu des résultats concluants

Phase IV : Elle a pour objectif de suivre l'utilisation à long terme du médicament une fois qu'il est sur le marché. Cela permet de surveiller les effets secondaires plus rares et de comprendre comment le médicament est utilisé dans des conditions réelles. Cette phase, appelée pharmacovigilance, vise à garantir la sécurité continue du médicament après sa commercialisation.

Ces essais cliniques sont très encadrés par la loi, ils doivent répondre à des critères organisationnels et éthiques strictes pour garantir la sécurité des patients. L'intérêt des personnes doit toujours primer sur ceux de la science et de la société. Pour démarrer un essai clinique en France, la société doit recevoir l'avis favorable d'un comité de protection des personnes et une autorisation de l'Agence National de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM). Les recherches sont menées sous la direction d'un investigateur (médecin ou personnes qualifiées dans le domaine) et il doit informer les personnes participantes à l'étude et recueillir par écrit le consentement de chaque personne acceptant de participer à l'étude. (38)

B. Résultats TG6002

1. Pré-clinique

Comme vu précédemment, la double délétion permet d'améliorer la réplication sélective dans les cellules cancéreuses. L'avantage, par rapport à un virus simple délétion du gène *J2R* préexistant (codant pour la protéine TK), permet d'augmenter la sécurité dans les tissus non cancéreux.

Des essais pré-cliniques ont eu lieu pour confirmer la sécurité et la prolifération sélective du virus et également pour observer une efficacité de ce virus. Le modèle cellulaire colorectal LoVo a été utilisé car il est l'une des lignées les plus résistantes à l'oncolyse des VV *in vitro*, avec plus de 70 % de cellules survivantes à une infection MOI 10^{-3} (c'est-à-dire 10^{-3} pfu par cellule). Ces souris ont reçu une injection IV des deux virus (TG6002 et le VV simple délétion TK nommé $\Delta J2R/FCUI$ VACV) à 1×10^7 pfu. Le 5-FC ou un traitement fictif a été administré *per os* pendant 3 semaines à partir du jour 7 après l'administration virale.

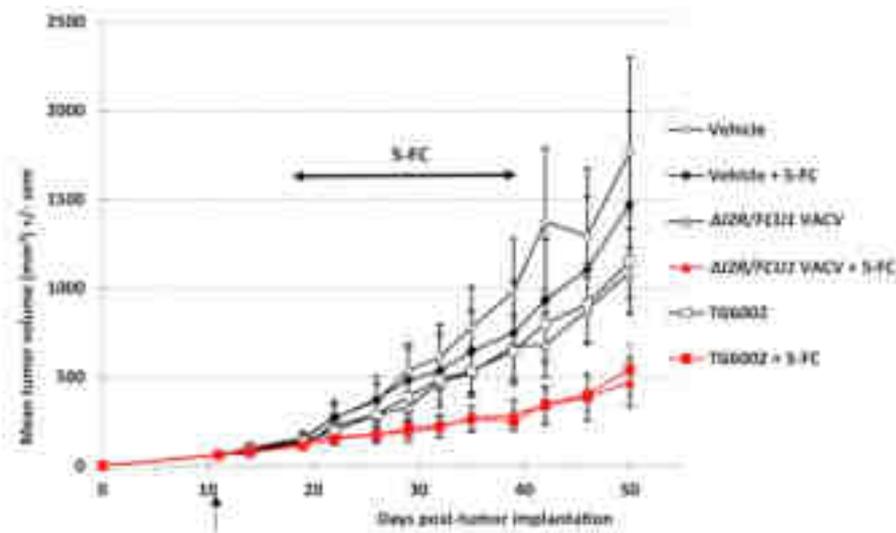


Figure 17 : Activité antitumorale des VV (29)

Comme le montre la Figure 17, une seule injection intraveineuse des deux virus a entraîné une inhibition de la croissance tumorale par rapport aux témoins. L'administration de 5-FC seule n'a eu aucun effet sur la croissance tumorale. En revanche, le traitement 5-FC a significativement amélioré l'activité antitumorale $\Delta J2R/FCU1$ VACV par rapport au virus seul, ce qui indique que l'approche FCU1/5-FC a compensé le manque d'activité oncolytique puissante du virus dans ce cas. Il en est de même lorsque le 5-FC a été co-administré avec TG6002 (les deux lignes rouges sur le graphique). Une activité comparable a donc été observée concernant le contrôle de la croissance tumorale induite par les deux virus seuls ou en combinaison avec le 5-FC.

En conclusion de ces tests sur les souris, TG6002 présentait une capacité à infecter et à se répliquer sélectivement dans les tissus tumoraux, par rapport aux tissus normaux, principalement dans des souris ayant un modèle de cancer colorectal humain sous-cutané. Les résultats de bio-distribution ont reflété une meilleure survie des souris traitées par voie IV avec TG6002 par rapport aux souris infectées avec le virus à simple délétion (29).

Une autre étude sur des chiens a également été réalisée. Les objectifs de l'étude étaient d'évaluer le profil d'innocuité et l'excrétion virale à la suite d'injections IV de doses croissantes de TG6002 et d'évaluer les réponses immunitaires induites par des injections de TG6002 chez des chiens sains. L'administration de TG6002 a été bien tolérée pour tous les chiens qui semblent éliminer rapidement le virus, limitant sa capacité à induire des effets indésirables. De plus, il n'a pas été révélé d'excrétion virale dans l'environnement (39).

2. Clinique

A la suite de ces résultats, deux études cliniques ont débuté avec deux indications différentes :

- La première indication portant sur l'administration IV de TG6002 chez des patients atteints de carcinomes gastro-intestinaux avancés,
- La deuxième portant sur une administration par l'artère intrahépatique chez des patients atteints d'un cancer colorectal métastatique à prédominance hépatique.

Ces deux études comporteront deux parties, la phase I qui va étudier l'innocuité à doses croissantes de TG6002 en association avec de la 5-FC par voie orale dans des cohortes consécutives de 3 à 6 patients. La phase II permet d'évaluer la sécurité d'administrations multiples de TG6002 en association avec la 5-FC ainsi que l'efficacité du produit.

Administration IV chez des patients atteints de carcinomes gastro-intestinaux avancés

En septembre 2022, un poster présentant les derniers résultats de la biodistribution et l'activité du virus TG6002 après administration IV chez des patients atteints de carcinomes gastro-intestinaux avancés a été présenté. Trente-sept patients ont été inclus dans cette étude et ils étaient séparés dans deux bras différents : le bras A avec une injection hebdomadaire de TG6002/5-FC et le bras B avec trois injections à 2 jours d'écart.

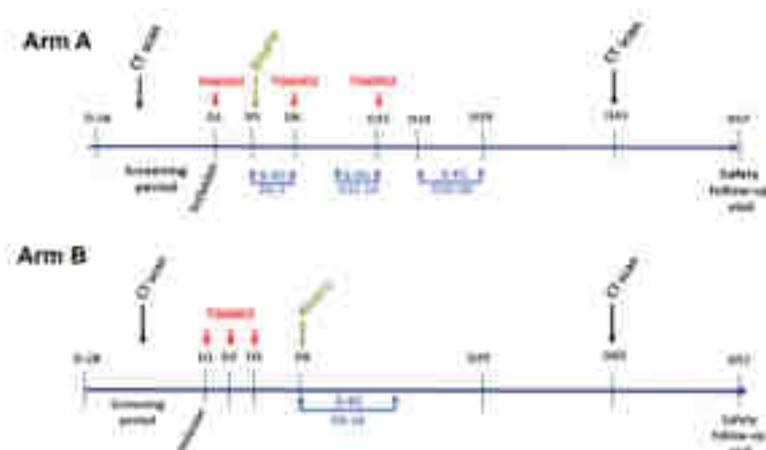


Figure 18 : Schéma d'administration des produits en fonction des bras

Les résultats présentés confirment que TG6002 est localisé dans la tumeur après administration IV, se réplique dans les cellules tumorales et est capable d'exprimer une charge virale fonctionnelle. Dans le bras A, une expression dose-dépendante dans le tissu tumoral a été observée à des niveaux plus élevés que dans le bras B. Les résultats du bras B montrent cependant que l'activité est détectée plus longtemps, jusqu'à 14 jours après le traitement lors d'un prélèvement sanguin. Cependant, l'administration d'une dose élevée de virus semble déclencher des mécanismes de limitation de l'activité qui nécessitent une attention particulière. (40)

En conclusion, le traitement est bien toléré et aucune toxicité majeure de nature à limiter le processus d'escalade de dose n'a été observée. Une fièvre transitoire est l'événement indésirable le plus courant. TG6002 parvient à atteindre la tumeur, à s'y répliquer, et à exprimer son armement après administration

IV. Ces résultats concluant sur l'administration par voie IV des virus oncolytiques permettraient d'étendre l'utilisation de ces thérapies à de nombreuses tumeurs solides (41).

Administration intrahépatique chez des patients atteints d'un cancer colorectal métastatique

En avril 2023, un poster a également été présenté pour cette indication. Un seul schéma d'administration a été réalisé et est détaillé Figure 19 (42).

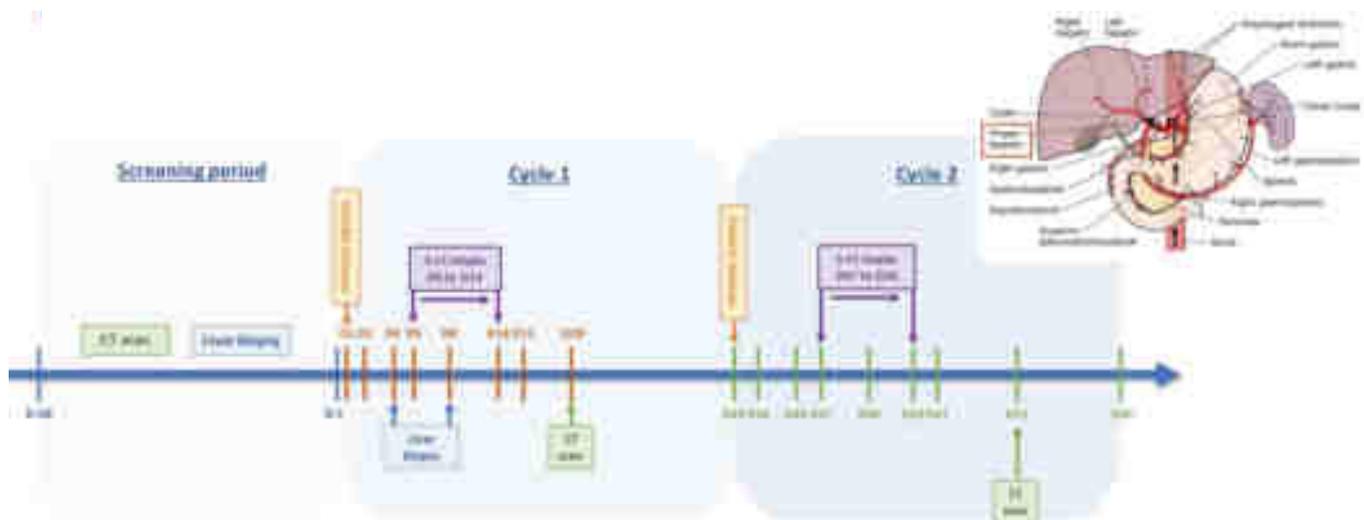


Figure 19 : Schéma d'administration des produits

Quinze patients ont reçu une perfusion de TG6002 dans l'artère intrahépatique au jour 1 à différentes escalades de dose, combinée à l'administration orale de 5-FU aux jours 5 et 14. Un second cycle de traitement TG6002/5-FU devait être administré aux patients sans progression de la maladie au jour 43. Des échantillons de sang et une biopsie sont aussi réalisés pour suivre la pharmacocinétique.

Les résultats présentés montrent une bonne activité de TG6002 avec la présence de 5-FU ainsi qu'une bonne répllication virale au sein de la tumeur. Les analyses des échantillons de sang montrent des signes d'activation des cellules T et l'expression des récepteurs du point de contrôle immunitaire ainsi que l'amorçage d'une réponse adaptative contre les antigènes associés à la tumeur.

C. Résultats BT-001

1. Pré-clinique

Avant l'évaluation de ce médicament en essais cliniques, des essais précliniques sur les souris ont été effectués. Les résultats décrits dans cet article (43) montrent des effets prometteurs pour ce virus avec la démonstration de différents mécanismes d'action (immunitaire et intrinsèque du virus) ainsi qu'une bonne efficacité.

Action sur les cellules Treg et T CD8+

Tout d'abord, il a été démontré que l'anticorps anti-CTLA4 (candidat 4-E03) a une meilleure régulation des LT régulateurs comparé à l'*Ipilimumab*, anticorps anti CTLA4 ayant une AMM pour le traitement de mélanome.

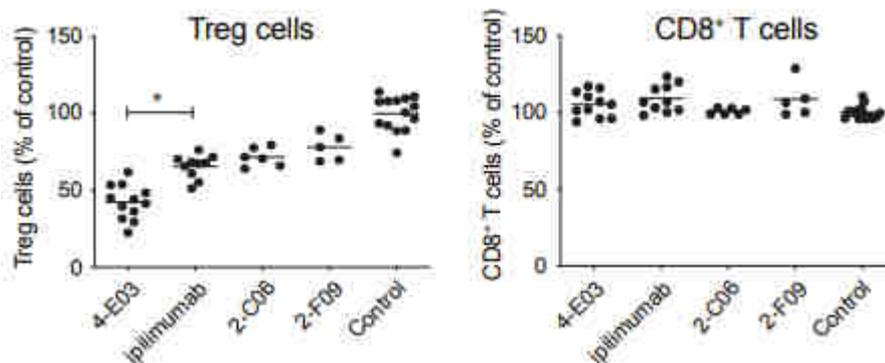


Figure 20 : Pourcentage de LTreg et de LT CD8 par rapport aux candidats testés

Ces graphiques présentent le pourcentage de LT CD8. Le clone 4-E03 montre une déplétion accrue des cellules Treg humaines mais pas des CD8 comparées à l'*Ipilimumab*. Ces découvertes indiquent que 4-E03 se lie à un épitope fonctionnellement distinct sur CTLA-4 et est associé à une déplétion en Treg plus forte.

Activité anti-tumorale du $VV_{GM-\alpha CTLA4}$

Afin de définir sur quel type de cancer le virus pourrait être efficace, une gamme de modèle de cancer de souris immunocompétentes a été utilisée. Cette gamme de modèle de souris cancéreux couvre des cancers hématologiques (A20) ainsi que solides d'origines différentes (CT26 BALB/c côlon ; EMT6 BALB/ c sein, MC38 C57BL/6 côlon et B16 C57BL/6 mélanome). Ces cancers ont un environnement immunitaire fort (CT26) ou immuno-exclus (B16). B16 est également connu pour posséder peu de cellules immunitaires et est également résistant à la fois aux anticorps anti-PD1 et anti CTLA4.

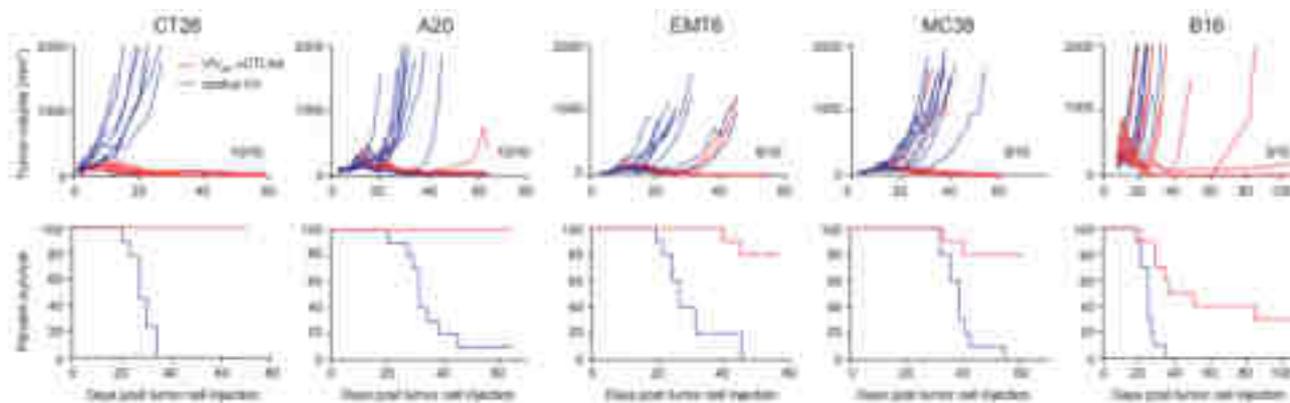


Figure 21 : Survie après traitement par BT-001 dans plusieurs modèles de tumeurs

Ces graphiques présentent le volume des tumeurs (graphiques du haut) et le pourcentage de survivant (graphique du bas) dans différents modèles de tumeurs. L'administration intratumorale (IT) de VV_{GM}- α CTLA-4 à ces différentes souris porteuses de tumeurs a démontré un effet positif sur la majorité des animaux, avec des taux de survie élevé. Dans le modèle B16, le VV_{GM} IT - α CTLA-4 a significativement retardé la croissance tumorale avec 3 animaux sur 10 qui ont survécu malgré les différentes résistances de ce modèle. Ces résultats ont indiqué un large potentiel thérapeutique du VV_{GM}- α CTLA-4 dans divers types de cancer.

Activité antitumorale systémique de longue durée

Il a aussi été démontré une activité abscopale au niveau des métastases. En effet, l'oncovirothérapie IT est censée induire ou améliorer l'infiltration de cellules inflammatoires au niveau de la tumeur traitée. Cela entraîne une présentation accrue de l'antigène tumoral, une migration vers les ganglions lymphatiques drainants et, après l'amorçage, un trafic de LT CD8 vers des lésions tumorales distantes.

Voie d'administration

Un autre test a comparé l'injection de virus IT et l'injection systémique. Il s'avère que le VV_{GM}- α CTLA-4 IT a augmenté le nombre des LT CD8 spécifiques de la tumeur plus efficacement que l' α CTLA-4 systémique qui avait également une grande quantité d'anticorps au niveau tumoral.

VV_{GM}- α CTLA-4 IT en combinaison avec α PD-1

Ces précédentes observations ont démontré que le VV_{GM}- α CTLA-4 agissait localement dans les tumeurs injectées, par des mécanismes impliquant la présentation de l'antigène tumoral dépendant de l' α CTLA-4 et la déplétion des Treg, afin d'initier une immunité antitumorale adaptative ainsi qu'une efficacité dans les tumeurs périphériques spécifiques. L'idée d'associer un autre agent thérapeutique avec ce virus est apparue afin d'avoir une mobilisation plus accrue des LT CD8 vers la tumeur. L'anticorps α PD-1 agirait principalement en empêchant l'épuisement des LT et peut-être en mobilisant les LT CD8 mémoire vers les tumeurs. Malgré la capacité de l' α PD-1 à améliorer la survie dans plusieurs cancers solides d'origine différente, il n'améliore pas les résultats chez les patients atteints de « tumeurs froides » (c'est-à-dire peu infiltrée par des cellules immunitaires).

Des tests ont été réalisés pour vérifier cette combinaison thérapeutique sur la base du modèle B16 (Figure 22 A), faiblement immunogène et A20 (Figure 22 C).

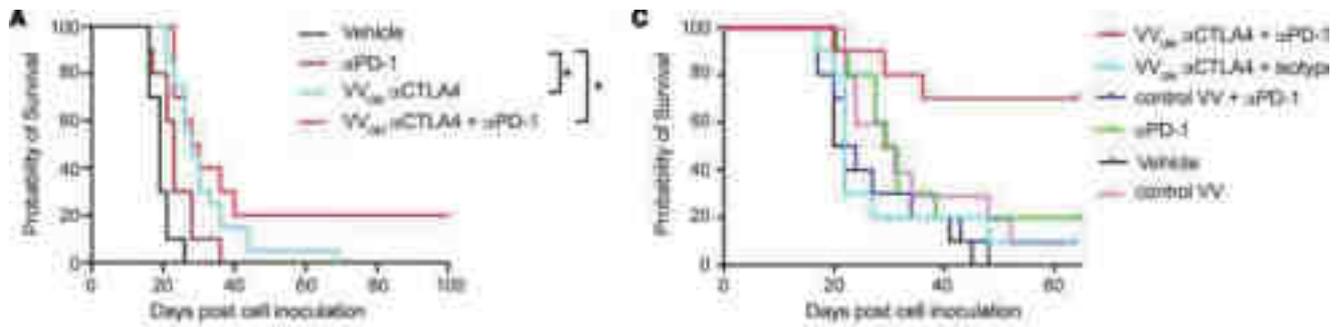


Figure 22 : VVG_m-αCTLA-4 IT en synergie avec PD-1 dans différents modèles tumoraux

Sur ces graphiques représentant les résultats en fonction de 2 types de tumeur, la courbe représentant VV_{GM} -αCTLA-4 associé à l'αPD-1 présente une plus importante probabilité de survie (20 % pour le modèle B16 résistant aux traitements des points de contrôle immunitaire) comparé aux deux anticorps administrés seuls. Le traitement combiné avec le VV_{GM} -αCTLA-4 a induit un fort afflux de cellules T dans les tumeurs B16.

2. Clinique

A la suite de ces résultats prometteurs, une étude clinique portant sur l'administration de VV_{GM}-αhCTLA4 (BT-001) seul et en association avec αPD-1 à des patients atteints de tumeurs solides métastatiques ou avancées a démarré. Cette étude se déroule en 3 parties :

- Phase I, partie A : Administrations intra-tumorales (IT) répétées de BT-001 en monothérapie, chez des patients atteints de tumeurs solides métastatiques/avancées ; l'escalade de dose sera employée.
- Phase I, partie B : administrations répétées par voie IT de BT-001 en association avec des perfusions IV de pembrolizumab chez des patients atteints de tumeurs solides métastatiques ou avancées.
- Phase IIa : Administrations IT répétées de BT-001 en association avec des perfusions IV de pembrolizumab dans plusieurs cohortes de patients atteints de tumeurs solides métastatiques ou avancées définies (44).

A la suite des premiers résultats, un communiqué de presse (45) a annoncé les données initiales issues de la partie A de la Phase I. BT-001 administré seul est bien toléré, avec des premiers signes d'activité antitumorale observée dans une population difficile à traiter. Les premiers résultats sont les suivants :

- Plusieurs jours après administration, le virus a été retrouvé dans les tumeurs. Cela suggère que BT-001 est capable de persister et de se répliquer dans les tumeurs.
- Ce résultat est cohérent avec l'expression de l'anti-CTLA-4 observée dans les tumeurs, sans exposition systémique détectable.

- Aucune propagation de BT-001 dans le sang ou les fluides biologiques n'a été détectée, ce qui suggère une spécificité tumorale élevée.
- Une diminution de la taille de la tumeur a été observée chez un patient de la première cohorte.

Cette première phase vise à déterminer la tolérance du BT-001 et à déterminer le schéma d'administration. Les patients atteints de tumeurs métastatiques/avancées reçoivent actuellement une monothérapie IT répétée de BT-001 (toutes les 3 semaines) ainsi qu'une augmentation de la dose. Cette partie va pouvoir inclure jusqu'à 18 patients. Les deux premiers niveaux de dose ont été administrés avec succès et 12 patients ont été traités à ce jour. Le Comité d'examen de la sûreté (Safety Review Committee, SRC) a déclaré que le profil d'innocuité permet de procéder à l'évaluation du niveau de dose le plus élevé dans la phase I, partie A.

La production de ces virus afin d'être administré aux patients suit des contraintes particulières. Afin d'assurer la sécurité du personnel et surtout la qualité du produit, des lignes de production spécifiques ont été installées. Le détail de ce processus de production va être détaillé dans la partie suivante.

PARTIE II : Processus de production spécifique

I. Production de médicament injectable

La production de médicament injectable est soumise à de nombreuses normes. Le produit doit être exempt de tous micro-organismes afin d'assurer la sécurité du patient à qui le médicament est administré. Chaque pays a ses normes et ses contraintes (concernant la conception des locaux, les équipements, les contrôles...) et une entreprise productrice doit se soumettre à ces différentes normes en fonction des exportations de son produit. Dans ce rapport, nous nous baserons principalement sur les normes françaises qui sont les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) (46).

A. Le contexte réglementaire

1. Bonnes Pratiques de Fabrication - Partie IV

La conformité aux BPF est obligatoire pour la fabrication de médicaments expérimentaux, de la même façon que pour tous les médicaments possédant une AMM. Depuis 2018 une nouvelle partie a été intégrée aux BPF, nommées Bonnes Pratiques de Fabrication spécifiques aux Médicaments de Thérapie Innovante (MTI). Ces nouvelles lignes directrices élaborent les exigences en matière de BPF qui doivent être appliquées dans la fabrication de MTI, que ce soit ceux qui ont obtenu une AMM, tout comme ceux utilisés dans le cadre d'essais cliniques. Cette partie des BPF ne s'appliquent qu'aux MTI, qui sont définis comme les :

- Médicaments de « thérapie cellulaire somatique »
- Médicaments « issus de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire »
- Médicaments de « thérapie génique »

Cette dernière catégorie concerne les virus oncolytiques fabriqués sur la plateforme invir.IO®. La définition d'un tel médicament biologique signifie que sa substance active contient ou constitue du matériel génétique. Ce médicament sera administré à des personnes en vue de réguler, de réparer, de remplacer, d'ajouter ou de supprimer une séquence génétique.

Pour la majorité des MTI, il n'y a pas le recul nécessaire pour connaître tous les risques liés à la production et à la qualité. Il existe alors une approche fondée sur le risque en fonction du produit afin de définir les mesures à mettre en place en termes d'organisation et de structure pour se conformer aux BPF. Les fabricants de MTI bénéficient d'une certaine flexibilité pour mettre en œuvre les mesures les plus appropriées compte tenu des caractéristiques spécifiques du procédé de fabrication et du produit. En effet, cela est important pour les MTI expérimentaux, en particulier dans les premières phases des essais cliniques (phase I et phase I/II) car la connaissance du produit est souvent incomplète (comme

son activité par exemple) et des pratiques sont améliorées en permanence (pour adapter le procédé de fabrication à l'évolution de la connaissance des produits).

La production de tel médicament doit donc garantir la qualité, la sécurité et la traçabilité du produit pour limiter un quelconque danger lors de l'administration au patient. Pour cela les BPF exigent plusieurs éléments :

- Une habilitation scrupuleuse du personnel
- Des règles d'hygiène précises
- Un contrôle de l'environnement et du produit
- Des vérifications/maintenances des équipements et des locaux
- Une traçabilité de chaque étape du produit (de la matière première à la réception du médicament)
- Des simulations de procédé aseptique

La production de virus oncolytique suit donc cette partie 4 des BPF par rapport aux normes des MTI mais il convient de suivre également l'annexe 1 des BPF qui se focalise sur les médicaments stériles. En effet, ces virus font partie des médicaments injectables et doivent donc être stérile. Ils sont injectés soit par voie IV soit par voie IT.

2. Bonnes Pratiques de Fabrication - Annexe 1

Cette annexe concerne la fabrication des médicaments stériles, ce qui est le cas pour tous médicaments injectables. Une nouvelle version a été approuvée le 22 août 2022 par la Commission Européenne et officiellement publié sur Eudralex Volume 4 (ensemble des règles et réglementations régissant les médicaments de l'Union Européenne) le 25 août 2022 (47).

La fabrication de tel médicament impose des exigences particulières en vue de réduire au minimum les risques de contamination microbienne, particulaire et pyrogène. Cette annexe définit les exigences minimales pour garantir la qualité, la sécurité et l'efficacité des produits pharmaceutiques et détail les exigences pour les zones à atmosphère contrôlée (ZAC), en particulier en ce qui concerne la classification des zones en fonction de leur contamination possible, les débits d'air et la surveillance environnementale. Ces exigences seront détaillées plus précisément dans la partie suivante.

L'annexe 1 précise aussi les exigences pour la validation et la surveillance de la stérilisation *via* la simulation de procédé aseptique ainsi que la garantie de la stérilité du produit. En effet, pour qu'un médicament puisse être injecté à un patient, il convient de garantir l'élimination de tous micro-organismes ou particules. Pour cela, une filtration terminale ou une stérilisation par la chaleur peut être réalisé.

Les exigences concernant les systèmes d'eau, de ventilation, et la gestion des déchets sont également précisées. La gestion des déchets est un élément important dans le cas d'utilisation de virus oncolytiques

puisqu'ils ne peuvent pas être éliminés directement. Ils doivent passer par une étape de désactivation virale avant d'être éliminés.

B. Locaux BPF

1. Conception

Les locaux doivent être conçus pour être conformes aux BPF afin de réaliser les opérations de production en respectant les normes de qualité requises, c'est-à-dire réduire au maximum les contaminations et les risque d'erreur. Il faut donc maintenir la propreté, l'entretien, les conditions de température et d'humidité du local, mais également empêcher l'entrée d'éléments indésirables (particules, fibres, carton...). La conception des locaux est donc très importante pour maintenir ce niveau de qualité. Ainsi, les flux de matériel (stériles et non stériles) et du personnel doivent être organisés et contrôlés. Ces flux sont travaillés pour que rien ne se croise et ainsi éviter tout risque de contamination. Toutes les surfaces exposées doivent être lisses et imperméables pour réduire la perte et l'accumulation de particules et de micro-organismes et pour permettre l'utilisation répétée d'agents de nettoyage. Tous les coins doivent aussi être arrondis pour faciliter le nettoyage.

L'atmosphère des locaux doit être contrôlée, que ce soit en matière de température, d'humidité mais aussi de renouvellement d'air et son niveau de surveillance augmente en fonction de la criticité des opérations. Les contrôles sont définis en fonction de la classe de propreté des ZAC. Il existe 4 classes différentes :

- **Classe A** : c'est une zone où sont réalisées les points ou opérations à haut risque tel que le produit en phase ouverte ou l'endroit où se situe les consommables qui sont directement en contact avec le produit. Cela correspond au point de remplissage, les bols de bouchons qui viendront fermer le conditionnement primaire, les flacons ouverts ou encore les points de raccordements aseptiques. Cette classe A est toujours sous flux d'air laminaire. Ces systèmes de flux d'air laminaire doivent délivrer de l'air circulant à une vitesse homogène définie qui a été démontrée et validée. Cette classe A se situe généralement au sein d'un isolateur (système entièrement clos avec le flux laminaire directement dans la chambre) ou d'un RABS (Restricted Access Barrier System, système non clos, le flux laminaire provient d'un soufflage au niveau du plafond). Ce dernier équipement doit obligatoirement être implanté dans un environnement de classe B.
- **Classe B** : cette zone permet de réaliser les opérations de préparation et de remplissage aseptiques, cette classe constitue l'environnement immédiat d'une zone de travail de classe A.
- **Classes C et D** : ces ZAC sont destinées aux étapes moins critiques de la fabrication des médicaments stériles.

Une ZAC de classe A va demander un habillage entier du personnel est une non-tolérance de la présence d'un micro-organisme, comparé à une classe D qui est plus souple au niveau des contrôles. Des règles d'hygiène strictes sont nécessaires dans ces locaux : il est interdit de fumer, manger, boire ou encore de ramener ses propres médicaments. Le maquillage ainsi que les bijoux sont exclus des ZAC. Le passage d'une classe à une autre doit se faire dans l'ordre : passage d'une zone non classés en classe D, puis C, B et enfin A. Le passage entre ces classes se réalise par des sas (matériel ou personnel) où l'habillage et la décontamination du matériel y est renforcé. Cependant, il est autorisé d'avoir un isolateur de classe A dans un environnement de classe C/D comme l'enceinte de l'isolateur est entièrement clos et qu'aucun opérateur ne travaille directement dans cette classe A.

Une zone de préparation du matériel stérile est également présente sur un site de production. Le lavage du matériel et l'autoclavage est nécessaire pour garantir l'asepsie de tout matériel utilisé pour un lot de production. De plus en plus de matériel à usage unique est utilisé mais certains consommables ne peuvent pas être changés à chaque fois, une validation du nettoyage est donc nécessaire pour garantir son utilisation. Le lavage et la stérilisation du matériel se réalise grâce à une machine à laver et un autoclave. Ces équipements sont qualifiés et les méthodes de lavage et de stérilisation sont validées.

Le personnel travaillant dans ces locaux est aussi un élément important. Il doit être formé sur les principes des BPF et également suivre une formation spécifique à l'hygiène, à la fabrication, aux contrôles et à la traçabilité du produit. Avant de participer aux opérations de fabrication aseptique, chaque opérateur doit réussir un test de simulation du procédé de fabrication, (qui sera expliqué plus précisément dans la partie II.C), et être formé aux exigences vestimentaires. Une réhabilitation à minima annuelle du test aseptique est obligatoire. Toutes les formations doivent être revues périodiquement pour éviter les dérives. La Figure 23 illustre un exemple d'habillage.



Figure 23 : Exemple d'habillement pour classe C / D (48)

La conception des locaux ainsi que la formation du personnel sont des éléments très importants dans la production de médicaments stériles. En plus de ces exigences, des surveillances continues de ces zones sont primordiales.

2. Surveillance de l'environnement

Le maintien de l'environnement prend en compte plusieurs éléments. Des centrales de traitement d'air (CTA) sont installées afin de maintenir la zone de production dans les conditions requises par les réglementations. Elles permettent de maintenir une cascade de pression entre les différents locaux par rapport à l'extérieur, d'assurer le taux de renouvellement horaire, les débits et ainsi d'assurer la qualité de l'air en zone. Un monitoring permanent des pressions est aussi effectué. En effet, des cascades de pressions entre les différentes classes de propreté sont mises en place pour éviter les contaminations. Par exemple, le sas personnel pour passer d'une classe D à une classe C sera moins élevé en pression que le local de classe C. Cela évite, lors de l'ouverture de porte, de faire rentrer de l'air d'une classe moins propre vers une classe plus propre.

Une surveillance microbiologique et particulaire est également effectuée au sein des zones de production. Plus le niveau de la classe augmente, plus la surveillance est renforcée. Dans une classe A/B les prélèvements microbiologiques et particulaires sont faits en continu, que ce soit du personnel ou des opérations de fabrication. Des prélèvements doivent aussi être réalisés après les opérations critiques ainsi qu'à la sortie de la zone de classe A/B. Un système de perte d'habilitation du personnel est mis en place reposant sur les résultats du programme de surveillance. En cas de perte d'habilitation, une nouvelle

formation est nécessaire avant que l'opérateur puisse participer de nouveau à des opérations aseptiques. Pour les classes C/D, il n'y a pas de surveillance microbiologique et particulière du personnel. Seuls des contrôles microbiologiques de l'environnement sont réalisés à intervalle régulier. Pour cela, des prélèvements de surfaces aux points critiques prédéfinis sont réalisés ainsi que des échantillonnages passifs et actifs : des boîtes de sédimentation remplies de milieux de culture préparés sont laissées ouvertes pour permettre aux colonies de bactéries de s'installer et de se développer. Ces contrôles permettent de respecter les limites réglementaires dictées par les BPF, présentés sur la Figure 24 ci-dessous.

Classe	Échantillon d'air UFC/m ³	Boîte de sédimentation (diamètre 90 mm) UFC/4 heures*	Gélose de contact (diamètre 55 mm) UFC/plaque	Empreintes de gant 5 doigts UFC/gant
A*	< 1	< 1	< 1	< 1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

* Certaines boîtes de sédimentation peuvent être exposées moins de 4 heures. Les limites indiquées dans le tableau s'appliquent également si les boîtes de sédimentation sont exposées moins de 4 heures. Ces boîtes doivent être exposées pendant toute la durée des opérations essentielles et être changées lorsque cela est nécessaire au-delà de 4 heures.

** Il convient de noter que le résultat attendu pour la classe A est de 0 UFC ; tout résultat supérieur ou égal à 1 UFC doit donner lieu à une enquête.

Les limites d'action recommandées sont les suivantes :

Classe	Nombre maximal recommandé pour des particules $\geq 0,5 \mu\text{m}/\text{m}^3$		Nombre maximal recommandé pour des particules $\geq 5 \mu\text{m}/\text{m}^3$	
	en activité	au repos	en activité	au repos
A	3 520	3 520	20*	20*
B	352 000	3 520	2 900	29
C	3 520 000	352 000	29 000	2 900
D	Définir une limite basée sur l'évaluation des risques	3 520 000	Définir une limite basée sur l'évaluation des risques	29 000

* La valeur de 20 est retenue du fait des limites de détection des équipements de surveillance. La détection répétée ou régulière de faibles quantités de particules en dessous de cette valeur nécessite une enquête.

Figure 24: Tableaux des conditions environnementales (particulaires et microbiologiques) recommandées par les BPF

La production aseptique comprend déjà énormément d'exigences et la production de virus oncolytiques vient y ajouter ses problématiques.

II. Les problématiques de la production de virus

La production de virus, que ce soit pour des vaccins ou pour des virus oncolytiques implique de travailler avec des organismes vivants. Les virus étant des éléments intracellulaires obligatoires, leur amplification doit se faire à travers des cultures cellulaires. Ces cultures ne peuvent pas provenir de lignées cancéreuses comme le produit doit être injecté à un patient, le risque de retrouver des traces de ces cellules est trop élevé. L'utilisation de cellules primaires est souvent envisagée, mais la variabilité d'une préparation à l'autre amène d'autres problématiques (confluence ou viabilité hétérogène).

Un autre problème est qu'ils sont d'une taille moyenne de 270 nm de largeur et 350 nm de longueur, ce qui est supérieure à 0.2 μm . Ils ne peuvent donc pas passer la stérilisation terminale demandée pour les médicaments injectables afin d'assurer la stérilité du produit. Une stérilisation par la chaleur n'est pas non plus envisageable comme le virus ne tolérerait pas ces conditions. La production doit donc se faire de manière entièrement aseptique, du début jusqu'à la fin du procédé.

A. Généralités

Pour produire à l'échelle industrielle du virus, plusieurs étapes sont à prendre en compte. Tout d'abord le virus est développé dans le secteur de la Recherche et du Développement afin de l'armer spécifiquement au niveau de ses transgènes. Une fois le virus créé, il est amené dans une première zone d'amplification afin d'amener la semence virale nécessaire pour aller en zone de production. Cette étape est appelée la production d'un pré-Master Virus Seed (pMVS). Ce pMVS va ensuite être utilisé en zone de production BPF pour créer la banque mère de virus, le Master Virus Seed (MVS). Cela correspond à un pool unique de virus qui a été préparé à partir d'un clone viral sélectionné dans des conditions définies, réparti en plusieurs récipients et stocké dans des conditions définies. Ce MVS permet ensuite de produire une banque de travail (Working Virus Seed : WVS), c'est-à-dire un pool homogène, utilisé pour la production de virus répartis uniformément dans un nombre de récipients dérivés d'une MVS et stockés de façon à garantir la stabilité. Grâce à ce WVS, la Drug Substance (DS) puis le Drug Product (DP), équivalent au produit fini pourront être produit. L'enchaînement de ces étapes est décrit Figure 25.

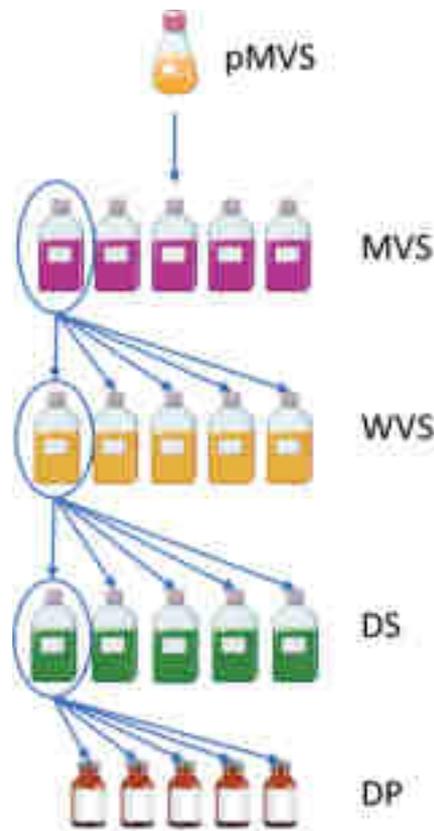


Figure 25 : Etapes générales de fabrication d'un virus oncolytique

Entre chaque étape, des contrôles qualité sont effectués pour vérifier que le produit est conforme aux spécifications. Le MVS aura un contrôle très renforcé, ainsi que chaque premier lot réalisé de chaque étape. Les autres flacons obtenus par une même semence mère auront des contrôles un peu moins stricts mais subiront toujours les contrôles nécessaires à la libération du lot comme le test de stérilité. Le DP sera aussi toujours étroitement contrôlé comme il s'agit de la dernière étape avant injection au patient. La quantité de WVS en fonction d'un flacon de MVS sera défini par le titre viral obtenu lors du lot de MVS et peut varier en fonction des lots produits. Ce système de production garantit la répétabilité des productions cliniques comme le MVS permet de fabriquer de multiples DS.

Le maître mot dans la production de virus est la sécurité, que ce soit celle du patient ou celle des opérateurs manipulant les virus. Cela est réalisé de deux façons : par le contrôle qualité qui permet d'acter la conformité du lot et de garantir la qualité du produit fini avant injection et par la documentation, la traçabilité, le choix des équipements et la destruction maîtrisée des déchets qui permet de sécuriser les opérateurs.

B. Etapes de production

La production des virus oncolytiques BT-001 et TG6002 suit majoritairement le schéma principal de fabrication. Etant en échelle clinique, l'étape de WVS n'est pas réalisée car il n'y a pas la nécessité

d'avoir autant de banque virale. Le Tableau 1 ci-dessous, tiré de l'annexe 2 des BPF (fabrication des substances actives et des médicaments biologiques à usage humain), nous donne les lignes directrices à suivre et les flexibilités pouvant être exempt des BPF, la deuxième ligne correspondant à la production de virus.

Type et source de la matière	Exemple de produit	Application de ce guide aux étapes de fabrication indiquées en gras			
1 Sources animales ou végétales : non transgéniques	Hépatines, insuline, enzymes, protéines, extraits allergéniques, vaccins vivants.	Collecte de plasma d'origine animale ou de liquide ¹	Décapage, mélange et/ou traitement préliminaire	Testement et purification	Formulation, répartition
2 Virus ou bactéries / fermentation / cultures cellulaires	Vaccins vivants ou bactériens, enzymes, protéines	Création et entretien de banques de cellules maître ² (Master Cell Bank, MCB), banque de cellules de travail (Working Cell Bank, WCB), et de souches primaires vivantes (Master Viral Seed, MVS) et de souches de travail vivantes (Working Viral Seed, WVS)	Culture cellulaire et/ou fermentation	Inactivation, lorsqu'applicable, testement et purification	Formulation, répartition
3 Biotechnologie / fermentation/cultures cellulaires	Protéines recombinantes, anticorps monoclonaux, allergènes, vaccins	Création et entretien de banques de cellules maître (MCB) et banque de cellules de travail (WCB), et de souches primaires (Master Seed Lot, MSL), et de souches de travail (Working Seed Lot, WSL)	Culture cellulaire et/ou fermentation	Testement, purification, modification	Formulation, répartition
4 Sources animales transgéniques	Protéines recombinantes.	Banque transgénique primaire et de travail	Décapage, mélange et/ou traitement préliminaire	Testement, purification, et modification	Formulation, répartition
5 Sources végétales transgéniques	Protéines recombinantes, vaccins, allergènes	Banque transgénique primaire et de travail	Culture, récolte ³	Extraction, testement, purification, modification	Formulation, répartition
6 Sources humaines	Enzymes dérivés de l'urine humaine	Collecte de liquide ⁴	Mélange et/ou traitement préliminaire	Testement et purification	Formulation, répartition
7 Sources humaines	Produits issus des tissus et cellules	Don, collection et contrôle des tissus/cellules initiées ⁵	Transformation, testement et purification	Testement, culture, purification de cellules, combinaison avec des composants non cellulaires	Formulation, combinaison, répartition

Voir le glossaire pour l'explication des abréviations



Tableau 1 : Etape de fabrication entrant dans l'annexe 2 des BPF

Ainsi, la production du pMVS peut être plus flexible et n'est pas soumise aux normes dictées dans les BPF. Cependant la production de MVS, WVS, DS (qui correspond à la culture cellulaire, à l'isolation et la purification) et DP (formulation et répartition), y sont soumis.

1. Production non BPF

La production d'un pMVS n'est donc pas soumise à toute la réglementation stricte des BPF. Mais dans le cadre de la manipulation de virus, il convient de mettre en œuvre une protection du produit mais aussi de l'opérateur et de son environnement. La production peut donc être réalisée sous PSM (Poste de Sécurité Microbiologique) dans une zone non classée. Un PSM correspond à une enceinte ventilée destinée à assurer une protection du manipulateur et de l'environnement grâce à une ventilation opposée à la sortie et grâce à une filtration à très haute efficacité de l'air, avant de le recycler ou de le rejeter. Il existe trois types de PSM, mais ceux utilisés pour la production de virus oncolytiques sont les PSM de type II (Figure 26).

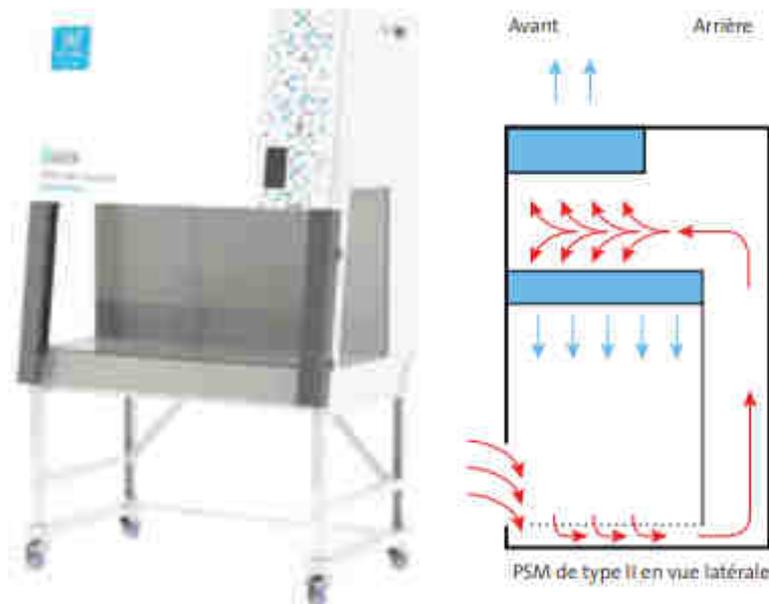


Figure 26 : Photo d'un PSM (à gauche) et schéma du flux d'air (à droite)

Ce type de PSM permet d'obtenir un flux laminaire au niveau du poste de travail et de limiter les risques de contamination. L'air est ensuite aspiré par l'arrière puis recyclé ou évacué à travers des filtres HEPA (filtre à air à haute efficacité) (49).

Toutes les étapes de fabrication d'un pMVS se réalisent sous PSM avec, pour certaines opérations plus critiques, des contrôles environnementaux (air passif et prélèvements de surface). Les étapes d'un pMVS se déclinent comme suit :

- Préparation d'une culture cellulaire : des œufs de poulet embryonnés sont utilisés. Après avoir ouvert les œufs et extrait les embryons, ces derniers sont mis en présence d'une solution enzymatique afin d'extraire les cellules qui nous intéressent : les fibroblastes. Une fois la digestion enzymatique terminée, un cycle de centrifugation est réalisé puis les culots cellulaires sont dilués dans du milieu de culture. La suspension obtenue est alors répartie dans des supports de culture pour cellules adhérentes.
- Infection : le virus précédemment conçu en recherche et développement est mis en contact avec

les fibroblastes afin qu'il s'y réplique.

- Piquage : Après un temps défini d'infection, des plages de lyse sont observables à l'endroit où le virus s'est répliqué. La plage est récoltée puis intégrée dans un nouveau support de culture.
- Amplification : Les virus intégrés dans ce nouveau support vont venir s'y répliquer. Plusieurs étapes d'amplification peuvent avoir lieu.
- Récolte : Une fois le temps d'amplification virale atteint, le support est récolté. Des tests de titrage sont réalisés pour définir la quantité de virus par unité formant plaque (pfu).

Après quelques tests réalisés sur les virus amplifiés et récoltés, ils vont pouvoir être emmenés en zone de production réglementée où ils seront réamplifiés pour en faire une banque de virus mère.

2. Production BPF

La production de virus oncolytiques en zone BPF étant entièrement aseptique, elle peut se réaliser sous isolateur de classe A qui est situé dans un environnement de classe C ou D, sous PSM de type II situé dans un environnement de classe B ou en bioréacteur à plus grande échelle. Les contraintes d'habillage et de contrôles sont plus strictes pour un PSM situé en classe B tandis que la manipulation minutieuse sous isolateur est plus compliquée. Lors de chaque étape de production, une surveillance microbiologique et particulière est mise en place : des échantillonnages passifs et actifs sont réalisés ainsi qu'un comptage particulière continu. A la fin des étapes de production, des prélèvements de surfaces aux points critiques sont réalisés (paroi de l'isolateur ou du PSM et les gants). Pour l'isolateur qui est un système clos, le flux d'air est réalisé par l'équipement. Il est en de même pour le PSM, mais comme il n'est pas entièrement fermé, l'environnement de classe B offre aussi un renouvellement d'air continu. La pression au sein de l'isolateur étant modifiable, ce dernier est mis en surpression par rapport à la zone de production car les virus utilisés ne sont pas volatiles et donc pas dangereux pour les opérateurs. La stérilité du produit est ainsi privilégiée si une fuite au niveau de l'isolateur devait avoir lieu. Si les virus avaient été dangereux, un puit de pression aurait été installé entre la classe A et la classe D lors de la conception.

Les différentes étapes de fabrication, que ce soit pour un MVS ou une DS sont quasiment identiques et sont détaillées ci-dessous. L'utilisation d'un isolateur étant plus contraignant pour la manipulation, il sera détaillé en tant qu'exemple.

La préparation de culture cellulaire

Cette étape utilise des œufs de poulet embryonnés et se déroule comme décrit dans la production d'un pMVS. La suspension mère obtenue à la fin de l'étape de centrifugation est ensuite transférée à l'extérieur de l'isolateur dans les bonbonnes de milieu de culture *via* le connecteur de transfert aseptique

que l'on peut voir sur la Figure 27. Ce système permet de transférer le milieu de culture de l'isolateur vers l'extérieur en gardant la stérilité du produit.

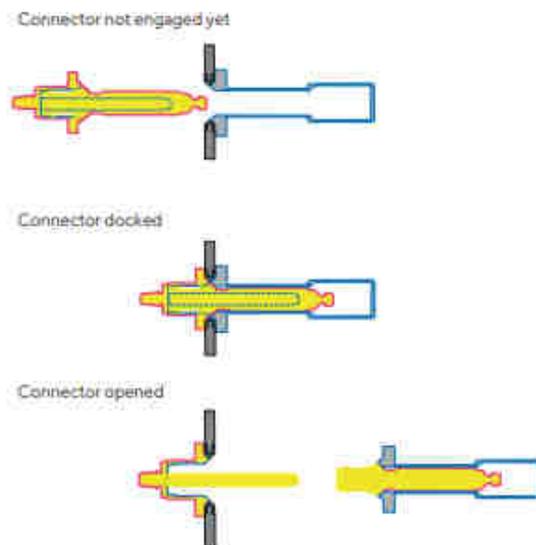


Figure 27 : Principe du système de transfert aseptique au niveau de la paroi de l'isolateur

La bonbonne et les supports de culture utilisés sont tous reliés par des tuyaux et des connecteurs stériles. Une fois la bonbonneensemencée par les cellules embryonnaires, les supports de culture sont remplis. Ils sont ensuite mis en incubation pendant plusieurs jours afin de laisser les cellules se multiplier et obtenir un tapis cellulaire assez confluent pour l'infection.

L'infection

L'infection se réalise par la suite grâce au candidat sélectionné lors du pMVS dont le titre viral est connu. La quantité de virus nécessaire est alors ajoutée sous isolateur dans un milieu de culture adéquat, puis transvasée dans la bonbonne d'infection *via* le même connecteur de transfert aseptique. Les supports de culture sont ensuite vidés de leur précédent milieu, puis le milieu virosé y est rajouté et les supports sont mis en incubation.

La récolte

Après plusieurs jours d'infection, la récolte du virus se réalise après secouage des supports pour décrocher les cellules. Le surnageant de chaque support, qui contient le virus ainsi que des débris cellulaires, est ensuite récupéré dans une poche pour être emmené à la prochaine étape. Des contrôles en cours de production sont également réalisés pour vérifier la conformité du lot à cette étape.

Cassage mécanique

Le cassage mécanique des cellules se fait par un mélangeur à haut cisaillement. Cet équipement permet de casser les cellules présentes dans la poche de récolte afin d'extraire le virus intracellulaire et aussi

d'éviter de collapser le filtre de clarification de la prochaine étape. Le mécanisme d'action de ce mélangeur se passe en 4 phases :

- La première phase consiste à faire parvenir la suspension virale à traiter contenue dans la poche vers la tête de travail. La haute vitesse de rotation des lames de rotor provoque un effet pompe permettant l'aspiration du milieu de culture.
- La deuxième phase permet de pousser la suspension virale vers les extrémités des lames du rotor grâce à la force centrifuge générée par la rotation du rotor. Le liquide va subir un fort taux de cisaillement mécanique en raison d'un faible entrefer entre rotor et stator.
- La troisième phase consiste à expulser la suspension virale à très haute vitesse à travers une grille percée de fines perforations calibrées. Une application d'un intense taux de cisaillement hydraulique à lieu. Le liquide rejoint alors le corps principal de la tête de travail.
- La quatrième et dernière phase consiste à expulser la suspension virale de la tête de travail vers la poche de milieu de culture à traiter. En même temps, le milieu est renouvelé dans la tête de travail, assurant le cycle de mélange.

Ces quatre phases successives génèrent un effet pompe permettant de faire circuler, mélanger, casser et traiter la totalité du volume de la poche de milieu en circuit fermé afin de maintenir la stérilité du produit.

Clarification

Une fois le contenu de la poche cassé au mélangeur à haut cisaillement, il va passer dans un filtre de clarification pour éliminer les débris cellulaires. Le filtre utilisé possède un taux de rétention de 5.0 μm , donc toutes les particules supérieures à cette taille ne passeront pas à travers le filtre. Un débit maximal doit être appliqué et contrôlé afin de ne pas collapser le filtre.

Purification par filtration en flux tangentiel (TFF)

La suspension virale clarifiée obtenue va ensuite passer dans une colonne à fibre creuse afin tout d'abord de concentrer le produit puis de changer de tampon. Cette étape se base sur le principe de microfiltration par filtration en flux tangentiel (TFF). La colonne utilisée dans ce type de filtration est composée de fibres creuses dont la paroi est constituée de pores. Le principe de la TFF consiste à faire circuler le liquide à filtrer parallèlement à une membrane poreuse. C'est la pression du fluide qui permet à celui-ci de traverser la membrane. Une partie du liquide composée des particules de tailles plus petites que les pores, appelée le perméat, réussit à traverser la fibre sous l'effet d'un gradient de pression. Les particules plus grosses se concentrent dans le liquide qui n'a pas traversé la membrane, appelé rétentat. Un schéma représentant le principe est décrit Figure 28.

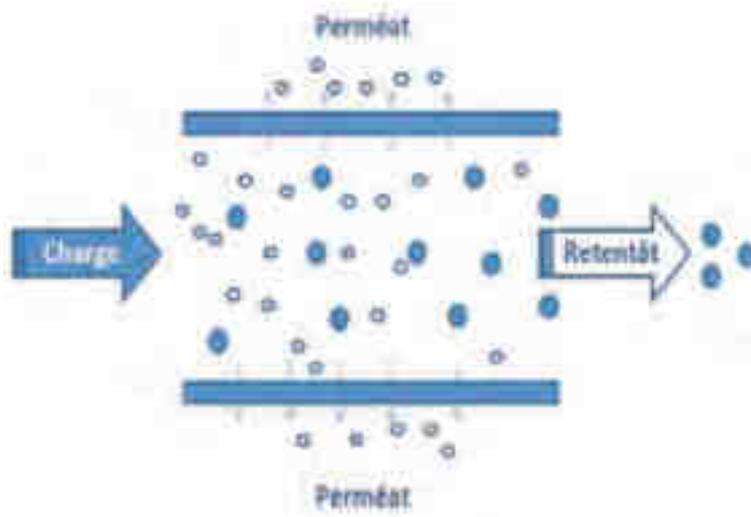


Figure 28 : Démonstration du principe de la TFF (50)

Le cisaillement (ou turbulence) créé par la circulation tangentielle du fluide, s'oppose au dépôt des particules sur la surface de la membrane. La résistance à l'écoulement et le colmatage des fibres sont donc minimales par rapport à ce qui se produit en filtration frontale. Ce type de filtration permet donc de filtrer avec un seuil de coupure très bas, des liquides relativement chargés en particules sans perte de charge et permet de maintenir une qualité de filtration constante tout au long de l'opération.

Plusieurs capteurs de pression sont présents afin de contrôler l'intégrité des fibres au sein de la colonne. Il y en a un au niveau de l'inlet (situé en bas de la colonne, endroit où arrive le produit), un au niveau du rétentat (en haut de la colonne) et le dernier au niveau du perméat (sur le côté de la colonne). Les pressions sont relevées toutes les minutes durant les phases de concentration et de diafiltration.

Cette étape de filtration tangentielle est composée de plusieurs phases :

- L'équilibrage chimique permet de faire circuler pendant plusieurs minutes la solution tampon en circuit fermé afin d'éliminer l'air des tubings et de la colonne. Cette étape permet également de faire la tare des capteurs de pression.
- La polarisation commence quand la suspension virale clarifiée circule dans la colonne.
- La concentration consiste à faire passer tout le contenu de la poche de suspension virale dans la colonne de filtration. Les pressions et le débit sont minutieusement contrôlés.
- La diafiltration permet d'éliminer le milieu de culture où était contenu le virus et de le remplacer par une solution tampon. Les pressions et le débit sont également contrôlés lors de cette étape.

Le produit obtenu à la fin de la diafiltration correspond à la DS concentrée dans son tampon. Le flacon réservoir de la DS est ensuite scellé pour être séparé du reste du montage.

Après ces deux étapes de filtration, les grosses particules ont été éliminées grâce au filtre de clarification et les petites grâce à la filtration à flux tangentiel.

Drug Substance et Drug Product

Le flacon de DS obtenu précédemment est emmené sous isolateur pour répartition. Des tests seront réalisés sur le produit (stérilité, titrage, pureté ...) avant de pouvoir formuler le produit en DP. Une fois les résultats obtenus, la dernière étape de répartition pourra alors être réalisée. Elle se fait dans des flacons en verre et peut se faire manuellement ou automatiquement sous isolateur. Cette étape est la plus critique car le produit est en phase ouverte avant son conditionnement, il est impératif que tout soit contrôlé. Une fois les flacons remplis et bouchés, ils sont amenés à la salle de mirage (ou inspection visuelle) où ils seront tous inspectés manuellement.

Mirage

Le mirage permet d'évaluer la qualité d'un produit injectable en inspectant son contenu ainsi que son contenant. Le mirage peut être réalisé soit par les opérateurs, soit par une machine. On parlera alors de mirage manuel ou de mirage automatique. Les virus oncolytiques étant un produit complexe à mirer, le mirage se fait manuellement. Ce processus inspecte et détecte chaque unité individuellement, afin d'éliminer les défauts de fabrication et du conditionnement primaire tels que :

- Les particules ou fibres visibles en solution.
- Les imperfections dans l'intégrité du contenant qui pourraient compromettre la stérilité du produit (par exemple un récipient fissuré).
- Les erreurs de remplissage pouvant affecter l'administration de la dose pour le patient (par exemple, volume de solution incomplet).

L'objectif principal du mirage est de produire des lots d'unités qui sont pratiquement ou sensiblement exempts de défauts. Actuellement, aucun processus d'inspection, qu'il soit manuel ou automatique, ne peut garantir l'élimination complète de tous les défauts visibles. Cependant, une bonne gestion des processus de fabrication, des produits et de l'environnement peut empêcher ces défauts de se produire, d'où l'importance de tous les tests réalisés aux étapes précédentes.

Le mirage manuel est réalisé grâce à un poste d'observation qualifié possédant un panneau noir et blanc afin de pouvoir observer tout type de contaminants (Figure 29). La source de lumière est également un élément important du mirage qui doit être compris entre 2000 lux et 3750 lux. (51)

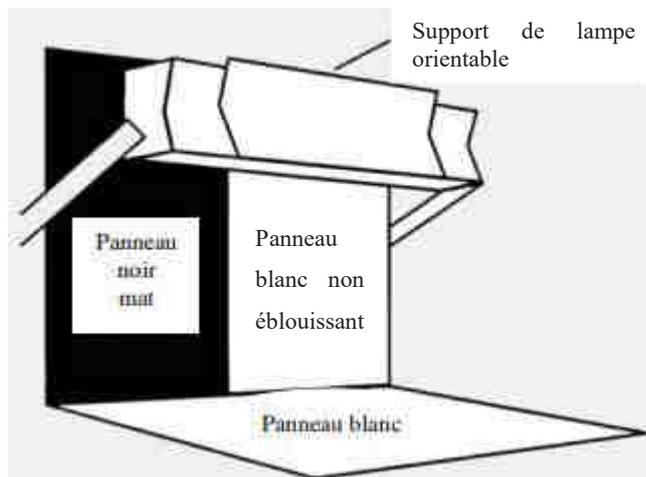


Figure 29 : Poste d'observation pour le mirage

Une fois le mirage terminé, un contrôle statistique du lot est réalisé puis ce dernier sera stocké en attente des résultats finaux pour ensuite être certifié par le Pharmacien Responsable.

La succession de ces différentes étapes permet donc l'amplification du virus oncolytique afin de produire un lot clinique complet, prêt pour envoi sur le site clinique.

C. Contraintes

1. Validation aseptique du procédé

Le procédé de fabrication des virus oncolytiques est donc entièrement aseptique et il est obligatoire de valider le procédé aseptique par un test de simulation de ce procédé. Deux simulations sont nécessaires : une pour la validation aseptique de la DS (Media Process Test ou MPT) et une pour la DP (Media Fill Test ou MFT). Ces tests consistent à reproduire les étapes de fabrication en faisant passer un milieu de culture à la place du produit. Il doit imiter le plus fidèlement possible le processus de fabrication aseptique et doit être effectué dans la même installation où la production a lieu. La simulation doit porter sur toutes les opérations effectuées par l'opérateur qui affectent la phase ouverte du processus. Il convient également d'envisager diverses interventions ainsi que des situations défavorables possibles comme :

- Le volume mis en œuvre et/ou le nombre d'unités réparties
- Des simulations en phase ouverte suffisamment longues pour qu'un ensemble représentatif de manipulations, de conditions de production (rotation d'équipe, début/fin de journée) et d'interventions critiques soient réalisées
- Le nombre de transferts en phase ouverte
- Le nombre et le type de connexions
- Les temps de préparation et de stockage du matériel stérile ou des intermédiaires de production en contact avec les surfaces critiques

Lors de la validation aseptique initiale, trois tests de simulations consécutifs et conformes doivent être réalisés, puis un test doit être répété à intervalle régulier pour fournir en permanence l'assurance de la capacité du procédé et du personnel à garantir une fabrication aseptique. La fréquence doit être déterminée en fonction d'une évaluation des risques, mais elle ne doit généralement pas être inférieure à une fois tous les six mois. Ces simulations permettent également d'habiliter l'opérateur à ces opérations et doit être renouveler une fois par an.

Pour ces simulations aseptiques, le choix du milieu de culture est très important, il doit être filtrable, peu sélectif, favoriser la récupération et être capable de faire croître un large spectre de micro-organismes.

Il faut que :

- La stérilité du milieu de culture soit vérifiée sur un échantillon préalablement à son utilisation.
- La fertilité du milieu de culture soit validée avant utilisation et à l'issue de la lecture finale des unités incubées

Toutes les unités/prélèvements intègres générés au cours du test doivent être incubés,

Pour déterminer les étapes à réaliser lors du MPT et du MFT, une analyse de risque pour chaque étape des deux processus est réalisée. Les étapes les plus critiques sont listées et un temps maximal des opérations est déterminé. Un compte rendu de production est alors rédigé prenant en compte les différents éléments discutés dans cette analyse de risque. Les résultats des simulations sont jugés conformes lorsque :

- L'ensemble des échantillons attendus a été incubé
- Les tests de stérilité et de fertilité du milieu de culture sont conformes avant les opérations
- Les tests de fertilité du milieu de culture sont conformes après les opérations
- Aucun échantillon incubé ne présente de contamination
- Les opérations ont été réalisées conformément aux comptes-rendus et au protocole de production
- La documentation d'enregistrement est complète et permet d'avoir une excellente traçabilité des opérations
- Tous les lots sont conformes aux critères d'acceptation ci-dessus.

Une fois que les trois MFT initiaux sont terminés et les résultats des incubations et des fertilités obtenus, un rapport de validation est rédigé, retraçant toutes les étapes. Le personnel ayant participé à l'étape obtient son habilitation dédiée à ces opérations.

En cas de modification importante du procédé (par exemple, la modification du système de traitement d'air, d'équipements, etc.), un nouveau test de simulation aseptique doit être réalisé. Dans ce cas, trois essais sont requis.

2. Qualification des locaux et équipements

La qualification des locaux et des équipements doit être établie pour confirmer qu'ils sont conformes aux opérations prévues. Comme pour la simulation aseptique, ces qualifications sont fondées sur une évaluation des risques qui doit être documentée. Concernant les MTI expérimentaux, la stratégie de qualification des locaux et des équipements doit tenir compte à minima du système de traitement d'air et des locaux. Ils doivent être qualifiés et adaptés pour permettre de contrôler de façon adéquate le risque de contamination par des particules viables et non viables. Les équipements critiques doivent également être qualifiés tel que l'isolateur. Les installations et les équipements doivent être réévalués à intervalles appropriés pour confirmer qu'ils sont toujours adaptés aux opérations prévues.

Les différentes étapes de qualification se déroule comme suit :

- **Définition du cahier des charges de l'utilisateur** : le fabricant doit définir les spécifications requises pour ses locaux ou ses équipements. Le cahier des charges doit prendre en compte la qualité des matériaux entrant en contact avec le produit ainsi que tous les paramètres critiques liés au produit ou au procédé de fabrication.
- **Qualification d'installation** : cette étape correspond à la vérification documentée attestant que l'équipement, tel qu'il est installé est conforme aux cahiers des charges. La qualification d'installation correspond à différentes vérifications comme la vérification documentaire, de la livraison, les instruments sont correctement étalonnés...
- **Qualification opérationnelle** : cette étape atteste que l'équipement, tel qu'il est installé fonctionne comme prévu dans les gammes de fonctionnement escomptées.
- **Qualification de performance** : cette étape atteste que l'équipement est capable de fonctionner efficacement et de manière reproductible d'après la méthode du procédé approuvée et les spécifications du produit

Un rapport résumant les résultats doit être rédigé qui permet de retracer les différentes étapes de qualification. Une qualification périodique de chaque équipement ou locaux est réalisée afin de maintenir les exigences soumises par le cahier des charges.

En résumé, la réglementation des établissements pharmaceutiques impose des normes pour garantir la qualité du produit et la sécurité du patient. Toutes les étapes de production doivent être maîtrisées et tracées. En cas de dérive par rapport aux comptes rendus existants, des déviations sont écrites avec investigations du problème pour éviter de réitérer l'évènement. Pour la fabrication de virus oncolytiques, il existe une certaine flexibilité pour l'étape du pMVS qui ne nécessite pas autant de contrôle que l'amplification virale. Cette dernière doit cependant suivre les règles des BPF avec la validation du processus en passant par une validation aseptique et les équipements utilisés doivent être qualifiés et

monitorés. Les différents consommables utilisés doivent aussi passer par une vérification pour s'assurer de la conformité du lot. Pour garantir que tout est respecté, des inspections des autorités de la santé sont régulières et délivrent un certificat BPF. Tous ces points permettent donc de certifier de la conformité d'un lot pour injection à un patient.

Les virus oncolytiques sont en plein essor, BT-001 et TG6002 ont des résultats prometteurs mais ils ne sont pas seuls dans la course contre le traitement du cancer. Un virus oncolytique a déjà eu une AMM en Europe, le Talimogene Laherparepvec (T-Vec), un herpès virus de type 12 (HSV-1) contre le mélanome, mais de nombreuses études sont en cours pour essayer de traiter tous types de cancer. Dans le monde, trois autres virus sont également commercialisés : Teserpaturev (HSV-1) dans le glioblastome au Japon approuvé en 2021 (52), Oncorine un adénovirus contre le cancer du foie, approuvé en Chine depuis 2006 (53) et la virothérapie RigVir depuis 2004 en Lettonie, Georgie et Arménie contre le mélanome (54)

PARTIE III : Concurrence

Les virus oncolytiques peuvent provenir de différentes espèces virales. Les deux virus étudiés proviennent du VV, mais d'autres familles de virus sont également très étudiées et en cours d'essais clinique. Le virus de l'herpès (HSV-1) et les adénovirus sont deux vecteurs prometteurs que certaines entreprises développent. Dans la suite de ce rapport, deux entreprises différentes vont être décrites, Replimune, travaillant avec le HSV-1 et Candela axée sur les adénovirus.

I. Replimune

Replimune est une entreprise de biotechnologie basée aux Massachusetts aux Etats-Unis et engagée dans le domaine de l'immunothérapie oncolytique qui produit des médicaments en phase clinique. Sa plateforme Immulytic conçoit et développe des produits candidats destinés à activer le système immunitaire contre les tumeurs solides. Les principaux candidats médicaments comprennent RP1 (vusolimogene oderparepvec), RP2 et RP3 qui sont en essais cliniques de phase I/II (illustration Figure 30). RP1 est le produit le plus avancé, avec une injection d'environ 240 patients atteints de diverses tumeurs solides.



Figure 30 : Portefeuille clinique de la société Replimune

Ces immunothérapies oncolytiques se basant sur le virus de l'herpès, appartiennent à une nouvelle classe de thérapies anticancéreuses avec un double mécanisme d'action : ils agissent en détruisant directement les tumeurs et en modifiant le microenvironnement tumoral, libérant ainsi des antigènes dérivés de la tumeur de manière immuno-stimulante. Cela permet de déclencher une réponse immunitaire systémique forte et durable contre le propre cancer du patient. Les virus sont administrés en combinaison avec d'autres traitements (chimiothérapie, immunothérapie, radiothérapie) en raison de l'action synergique et du profil de sécurité déjà étudié de ces traitements. (55)

A. Virus de l'herpès

Le virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) appartient à la famille des *Herpesviridae* du genre *Herpesvirus*.

C'est un virus à ADN double brin linéaire de 152 kb qui contient environ 90 unités de transcription et au moins 84 codent pour des protéines. Il est entouré d'une capsidie icosaédrique et d'une enveloppe lipidique (56). L'HSV-1 est pathogène pour l'Homme, il infecte de manière productive les cellules épithéliales et de manière latente les neurones sensitifs. La latence est une réponse adaptative qui permet au virus d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte et d'exister au sein d'une organisation génomique qui peut se réactiver et se propager lors de la reconnaissance de signaux de danger. L'infection au HSV-1 peut se manifester par des symptômes bénins voire asymptomatiques avec un tropisme majoritairement oro-labiale qui provoque des lésions vésiculeuses. Lorsqu'il infecte les yeux ou le système nerveux central, il peut provoquer alors des maladies plus graves (57).

L'HSV-1 pénètre dans les cellules par fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. Dans le cytosol, la capsidie est séparée des protéines de l'enveloppe cutanée et transportée vers le pore nucléaire par des protéines. Le génome viral de base linéaire dans la capsidie et libéré dans le noyau, où il adopte une structure circulaire. Une fois dans le noyau, le virus va prendre le contrôle et détourner la machinerie cellulaire comme l'ARN polymérase II, qui va lui permettre de transcrire ses gènes pour se répliquer.

Le HSV-1 a été le premier virus oncolytique génétiquement modifié dans le but initialement de traiter le gliome. Des gènes non essentiels impliqués dans sa croissance dans les cellules (comme la TK et la RR gène ICP6) ont été mutés afin de neutraliser les réponses antivirales innées et la pathogénicité (58). En effet, si le gène de la pathogénicité ICP34.5 est supprimé, le virus ne se réplique que lorsque la protéine PKR (Protein Kinase R) est inactive, protéine déficiente dans les cellules tumorales. (59)

L'HSV-1 Talimogene Laherparepvec (T-Vec) a été le premier virus oncolytique commercialisé aux Etats-Unis et en Europe pour le traitement du mélanome métastatique (60). T-Vec est un virus à double mutation avec des délétions dans les gènes ICP34.5 et ICP47, dans lequel le gène du facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages humains (GM-CSF) a été inséré. La délétion ICP34.5 permet donc de diminuer la pathogénicité avec une réplification sélective dans les cellules

tumorales et celle du gène ICP47 empêche la régulation à la baisse de l'expression du CMH-I, ce qui renforce les réponses immunitaires antitumorales. La délétion de ce gène entraîne aussi une réplication virale accrue dans les cellules cancéreuses par l'expression d'un gène voisin présent sur le génome viral. L'expression du GM-CSF est quant à elle destinée à renforcer l'induction de l'immunité antitumorale comme vu avec BT-001.

Le virus de l'herpès est donc un virus connu et intéressant par ses propriétés oncolytiques. De nombreux essais cliniques utilisant cette souche virale sont en cours dont plusieurs candidats sont développés par Replimune.

B. Armement

Replimune développe donc trois produits différents en essais cliniques. Ses thérapies nommées RPx sont conçues à l'aide d'une souche exclusive de HSV-1 et de transgènes d'activation immunitaire pour maximiser la stimulation des LT et l'activation immunitaire systémique.

1. RP1

Le premier candidat est RP1. Il est conçu pour traiter les types de tumeurs plus immunosensibles. Il est composé de virus de l'herpès modifié ICP34.5- et ICP47- dont le GM-CSF et GALV-GP R- ont été insérés. GALV-GP est une version optimisée en codons d'une puissante glycoprotéine membranaire fusogène (GP) du virus de la leucémie du gibbon (GALV) qui permet d'augmenter la capacité naturelle du HSV-1 à tuer les cellules tumorales. Ici, la séquence R a été déléetée (R -), ce qui confère des propriétés de fusion constitutives au GALV-GP. (61)

Pour obtenir ce virus spécifique, plusieurs virus ont été créés à partir d'une souche virale sélectionnée et ont été amenés en essais pré-cliniques afin de tester l'oncolyse et l'expression des différents transgènes insérés. Le virus n°16 (Figure 31) est le plus prometteur.

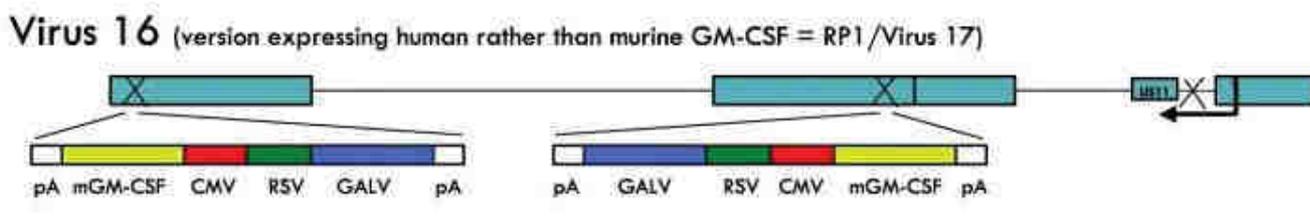


Figure 31 : Virus HSV-1 sélectionné pour les candidats RPx de Replimune

Ce virus exprime les gènes GALV et GM-CSF précédemment mentionnés, suivi de leur promoteur respectif RSV et CMV. Ces gènes sont situés dans les locus de ICP34.5- et ICP47- qui ont été déléetés. Une batterie de tests a été réalisée sur ce virus (61).

Activité de GALV-GP-R-

Les tests ont été réalisés sur des rats dans un modèle de tumeur bilatérale immuno-compétent. Ici, des cellules tumorales de rat ont été implantées dans les deux flancs de rats, puis les tumeurs du flanc droit ont été traitées avec un virus exprimant uniquement du GM-CSF (virus 19) ou exprimant à la fois GM-CSF et GALV-GP R – (virus 16). Dans ces expériences, une régression tumorale a été observée dans les tumeurs injectées et non injectées avec un effet significativement accru grâce à l'expression de GALV-GP-R -. Une autre expérience a été réalisée avec un traitement de 60 jours (Figure 32) sur les rats et cela a démontré qu'à la fois la tumeur injectée (partie droite du graphique) et la tumeur controlatérale non injectée (partie gauche) ont complètement régressé chez sept des dix animaux et que les rats traités sont restés exempts de tumeur jusqu'à la fin de l'expérience.

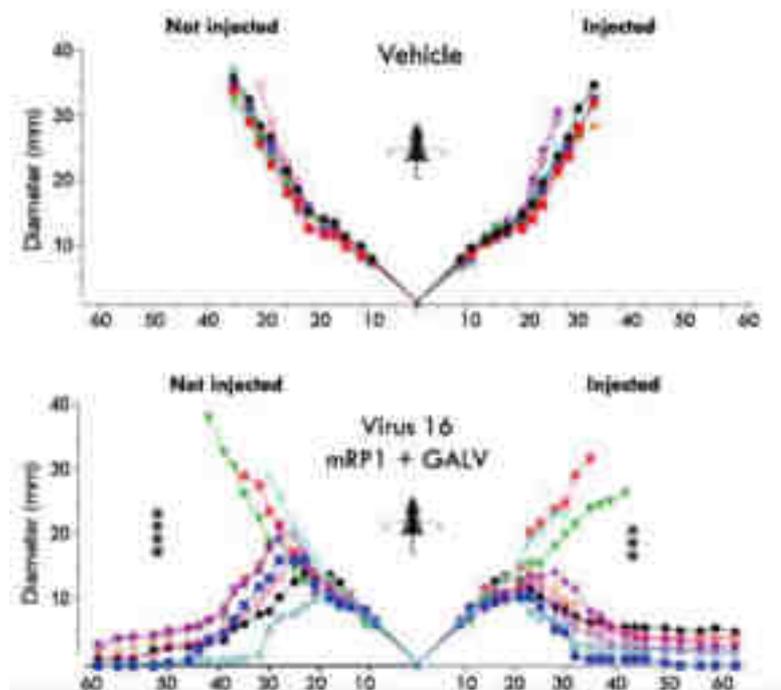


Figure 32 : Effet de GALV-GP-R- dans un modèle tumoral immunocompétent

Cette expérience a permis de montrer un effet abscopal avec régression des deux tumeurs, en prédominance avec le virus 16.

Infiltration des LT CD8 par le virus 16

Pour confirmer l'hypothèse selon laquelle le traitement local avec le virus 16 augmente les niveaux de cellules LT CD8 infiltrantes, des tumeurs bilatérales ont été établies dans les flancs de souris immunocompétentes avec le virus 16 injecté dans la tumeur du flanc droit. Les tumeurs injectées et non injectées ont été récoltées 10 jours après l'injection et évaluées pour la présence de LT CD8, de LT CD4 et de LT régulateurs (Figure 33).

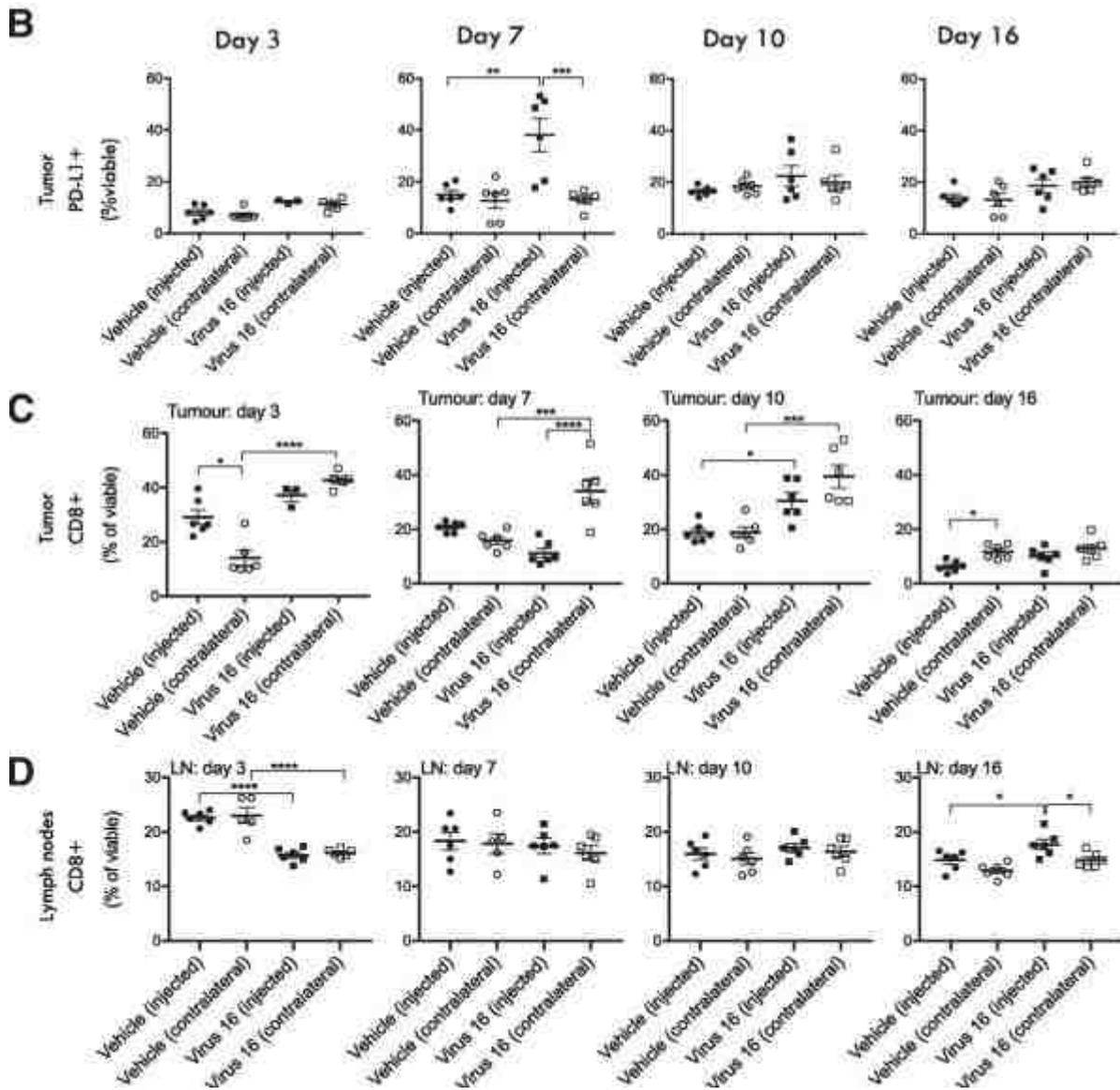


Figure 33 : Infiltration des LT CD8 et présence du ligand PD-L1 dans un modèle murin

Bien qu'il n'y ait eu qu'un effet limité sur le niveau des cellules LT CD4 et aucun effet évident sur les LT régulateurs, il y a eu une augmentation significative des cellules LT CD8 dans les tumeurs injectées et contralatérales non injectées chez les animaux traités par le virus, mais pas chez les témoins traités par le véhicule. En concomitance, le ligand PD-L1 a été dénombré et une augmentation significative au jour 7 s'est démarqué, principalement dans les tumeurs injectées chez les animaux traités. Le virus 16 permet donc d'augmenter le niveau de LT CD8 et de PD-L1, ce qui rend intéressant la synergie avec un anti PD-1.

Le virus 16 se réplique de manière productive dans les tumeurs injectées

Par les différentes expériences, la régression de la tumeur controlatérale non injectée était également observée. Une manipulation a alors été réalisée avec l'injection du virus 16 dans la tumeur droite puis les deux tumeurs sont récoltées à 3, 7 et 10 jours. Les taux de virus vivants présents dans chaque tumeur ont été déterminés par titrage. Les résultats ont montré qu'au jour 7, le virus a été détecté à des niveaux au moins équivalents à la quantité initiale de virus dans les tumeurs injectées. Cependant, dans les ganglions lymphatiques drainants, la quantité retrouvée est plus faible. Aucun virus n'a été détecté dans les tumeurs non injectées. Cela a confirmé que le virus reste localisé aux sites d'injection et que les effets de régression sont dus à des effets systémiques immunitaires, et non au trafic de virus des tumeurs injectées aux tumeurs non injectées.

Ces différents tests pré-cliniques ont permis de conclure que le virus HSV-1 délété des gènes ICP34.5 et ICP47 et dont un gène codant pour la protéine fusogène GALV-GP-R – et GM-CSF ont été ajoutés est prometteur. Il permet une augmentation de l'effet oncolytique direct avec infiltration du système immunitaire et une augmentation des PD-L1 permettant une synergie potentielle avec des médicaments déjà sur le marché, utilisés dans les standards de traitement. Ce virus a donc donné lieu au candidat RP1 de Replimune actuellement en essai clinique de phase I/II. D'autres modifications ont eu lieu sur le virus 16 pour essayer d'améliorer encore l'effet systémique et sera décrit dans la partie suivante.

2. RP2 / RP3

Les candidats RP2 et RP3 sont des versions optimisées du virus 16 précédent. Le but de la modification de ce virus 16 était de se concentrer sur l'insertion de gènes codant pour des protéines qui exercent leur action au sein de la tumeur ainsi qu'au moment du déclenchement de la réponse immunitaire (c'est-à-dire dans les tumeurs injectées et les ganglions lymphatiques drainants). Cela évite l'expression de protéines qui seraient nécessaires au niveau systémique pour avoir un effet maximal.

RP2 code en plus un anticorps anti-CTLA-4 pour traiter des tumeurs plus immunologiquement silencieuses. RP3 exprime en plus une paire de ligands activant la voie de costimulation immunitaire, CD40L et 4-1BBL mais n'exprime pas le GM-CSF. Ces deux ligands de costimulation permettent d'augmenter encore la puissance des réponses immunitaires pour traiter les tumeurs immunologiquement froides. 4-1BBL est un ligand transmembranaire présent sur les CPA qui se lie au récepteur des LT provoquant une co-stimulation des LT (62).

Ces deux candidats ont été amenés en essais cliniques après des tests pré-cliniques encourageants. Le virus 16 a donc été modifié pour exprimer soit une molécule de type anticorps anti-CTLA-4, soit CD40L, OX40L ou 4-1BBL de souris. Ces virus ont été testés dans le modèle de souris avec deux lymphomes collatéraux en utilisant une faible dose de virus (*Figure 34*).

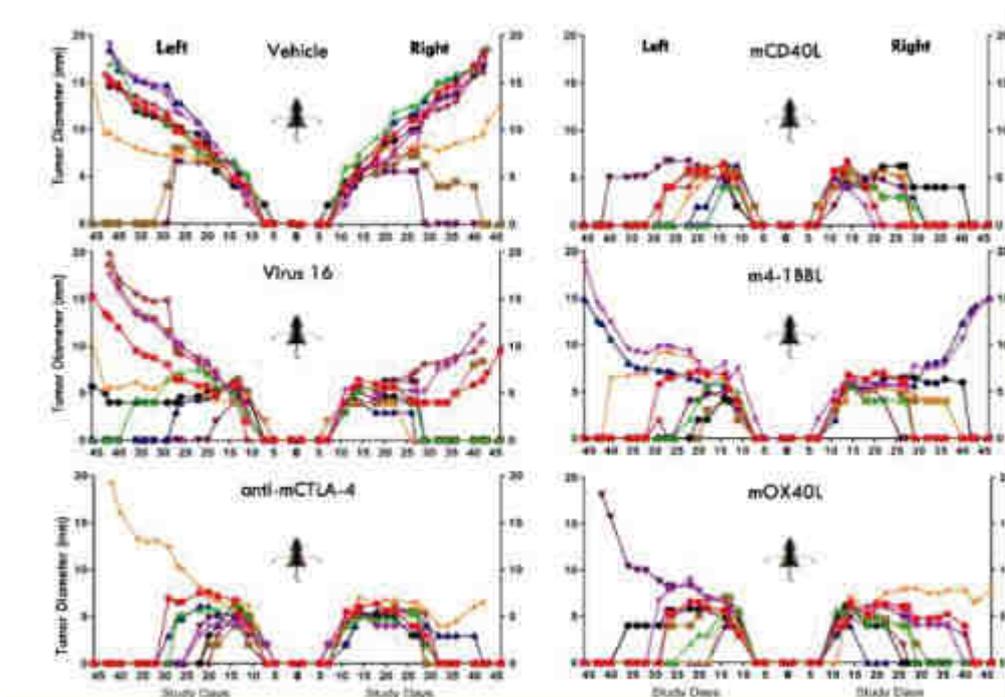


Figure 34 : Courbe de croissance tumorale en fonction des virus injectés

Comparé au virus 16, une régression tumorale est observée pour les autres virus intégrant les molécules d'intérêt, en particulier pour le CD40L où la régression est quasi complète pour chaque souris. Cela a permis de démontrer que la délivrance médiée par le virus de chacune de ces protéines était efficace pour augmenter l'effet antitumoral, non seulement dans les tumeurs injectées mais plus nettement dans les tumeurs non injectées.

Ces études pré-cliniques étant concluantes, ces virus ont ensuite été emmenés en essais cliniques pour différentes indications.

C. Résultats cliniques

1. RP1

RP1 est inclus dans trois essais cliniques différents.

CERPASS

L'essai de phase II CERPASS utilise le RP1 combiné au Cemiplimab, un anti-PD1 pour traiter le carcinome épidermoïde cutané. Les patients inclus dans cet essai ont déjà eu un traitement anti-PD1 qui n'a pas été concluant. Ils reçoivent donc le Cemiplimab par voie intraveineuse toutes les 3 semaines en association avec RP1 administré en injection intratumorale toutes les 3 semaines (63). Tous les patients nécessaires à l'étude ont été recrutés (N=211). Les données de l'étude ne sont pas encore publiques mais les premiers résultats devraient être publiés durant le troisième trimestre de 2023. (64)

IGNYTE

L'essai de phase I/II IGNYTE utilise le RP1 combiné au Nivolumab, un anti-PD1, dans trois indications différentes qui incluent des patients ayant déjà eu un traitement anti-PD1 non concluant. RP1 est injecté en IT et le nivolumab en IV.

- Le mélanome : cette étude a inclus n = 125 patients. Le résultat des 75 premiers patients a été communiqué à l'ASCO en juin 2023. Il est ressorti qu'une bonne infiltration des LT CD8 au niveau de la tumeur ainsi qu'une augmentation de l'expression de PD-L1 a bien lieu. Les données sur les biomarqueurs démontrent que le traitement par RP1 associé au nivolumab augmente également l'activation immunitaire (65). Le taux de réponse global est de 37,4 %, avec une activité cliniquement significative dans l'ensemble des paramètres de mélanome cutané en échec anti-PD1 inclus, y compris chez les patients présentant une charge tumorale modérée à élevée et une maladie viscérale. Le RP1 continue d'être généralement bien toléré, les données d'innocuité montrant principalement des effets secondaires pseudo-grippaux de grade 1-2 indiquant une activation immunitaire systémique. Les données initiales montrent que RP1 détruit les tumeurs à la fois localement et systémiquement, y compris chez les patients qui ont progressé lors d'un traitement antérieur par anti-PD1. Les résultats sont concluants et la suite de l'étude sera communiquée fin de l'année 2023 (66).
- Cancer MSI-H (cancer ayant une instabilité génétique) (67) : pas de résultat communiqué pour le moment.
- Cancers cutanés non-mélanome : Le recrutement se poursuit dans la cohorte de patients en échec anti-PD1 avec une mise à jour des données attendue au troisième trimestre 2023 (64).

ARTACUS

L'essai de phase I/II ARTACUS traite les cancers de la peau chez les greffés d'organes solides. Il utilise le RP1 en monothérapie en injection IT. Le blocage du point de contrôle immunitaire systémique est contre-indiqué dans le cadre d'un cancer de la peau non mélanique associé à la transplantation d'organe solide compte tenu du risque documenté de rejet d'allogreffe (68). Le recrutement des patients pour cet essai clinique de monothérapie chez des receveurs de greffe d'organe solide atteints de cancers de la peau est toujours en cours (64). Le cancer de la peau non mélanique est la tumeur maligne post-transplantation la plus courante chez les receveurs. Le carcinome épidermoïde cutané et le carcinome basocellulaire représentent plus de 90 % des cas (69). La monothérapie RP1 a montré une activité anti-tumorale claire, avec un taux de réponse de 27,3 % chez les patients évaluable et aucun événement indésirable à médiation immunitaire ou signe de rejet d'allogreffe n'a été observé. Le profil d'innocuité montre le même schéma que l'essai IGNYTE (68).

2. RP2 / RP3

RP2 et RP3 sont utilisés dans plusieurs indications de cancers solides faciles à injecter tel que le cancer colorectal, le carcinome épidermoïde de la tête et du cou et le carcinome hépatocellulaire.

Des études préliminaires sur RP2 ont permis d'observer l'innocuité, la tolérance et le taux de réponse du virus, en combinaison avec le nivolumab. Ces études ont été réalisées sur des patients atteints de mélanome uvéal métastatique, cancer qui dispose de peu d'options thérapeutiques efficaces. Les résultats ont démontré un profil de sécurité favorable et une activité antitumorale significative. Ces données permettent de soutenir l'idée que ce virus peut apporter un bénéfice clinique favorable pour les patients atteints de tumeurs difficiles à traiter ou ne répondant pas au traitement (70).

RP2 et RP3 en association avec l'atezolizumab et le bevacizumab dans le cancer colorectal

Le cancer colorectal est le troisième cancer diagnostiqué le plus fréquent. Ces essais de phase II vont injecter le RP2 ou le RP3 en combinaison avec l'atezolizumab (un anticorps anti-PD-L1) et le bevacizumab (71) (un anticorps anti-VEGF qui va permettre de faire régresser ou inhiber les vaisseaux tumoraux, limitant ainsi la croissance de la tumeur (72)). Deux cohortes de 30 patients chacune sont en cours de recrutement. La première cohorte traitera des patients par l'atezolizumab associé au bevacizumab injecté en IV et au RP2 injecté en IT et la seconde cohorte par l'atezolizumab et le bevacizumab (IV) et le RP3 (IT).

RP3 dans le carcinome épidermoïde de la tête et du cou

Le cancer épidermoïde de la tête et du cou fait partie de 90% des cancers de la tête et du cou. Un essai clinique à deux cohortes a été choisi : la première cohorte de 100 patients atteints d'une maladie localement avancée sera randomisée pour recevoir soit une chimiothérapie standard de soins (SOC) combinée à une radiothérapie, soit une RP3 combinée à une chimiothérapie et une radiothérapie suivie d'un traitement adjuvant par le nivolumab. La seconde, la cohorte recrutera 30 patients atteints d'un cancer épidermoïde de la tête et du cou récurrent ou métastatique avec de faibles niveaux de PD- L1 qui seront traités par chimiothérapie, nivolumab et RP3 (schéma clinique illustré Figure 35) (73)

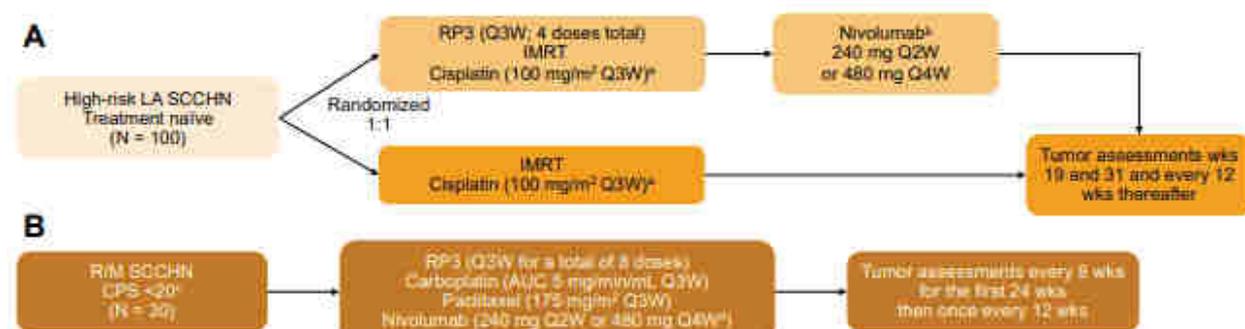


Figure 35 : Schéma clinique du RP3 dans le carcinome épidermoïde de la tête et du cou

RP3 en association avec l'atezolizumab et le bevacizumab dans le carcinome hépatocellulaire

Le cancer primitif du foie est le sixième cancer le plus fréquent et la troisième cause de décès liés au cancer dans le monde entier. Pour cet essai, deux cohortes de 30 patients chacune seront ouvertes. La première cohorte recrutera des patients traités par atezolizumab associé au bevacizumab et au RP3, et la seconde cohorte recrutera des patients qui ont progressé sous immunothérapie (y compris atezolizumab/bevacizumab), et seront traités par l'atezolizumab associé au bevacizumab et au RP3 (74).

Ces différents essais incluant RP2 et RP3 n'ont pas encore de résultats cliniques. Le programme de phase II des cohortes a été communiqué en juin 2023 et les résultats de phase I sont attendus pour fin de l'année 2023. Les résultats sont attendus avec impatience car les essais préliminaires sont prometteurs, surtout qu'un patient traité avec RP2 pour son carcinome mucoépidermoïde a eu une réponse complète au traitement. (75)

Après les VV et les HSV, d'autres espèces sont aussi étudiées comme les adénovirus. L'entreprise Candel va être décrite dans la suite de ce rapport afin de comprendre les avantages et les différences de cette espèce par rapport aux autres déjà discutées précédemment.

II. Candel Therapeutics

Candel Therapeutics est une société biopharmaceutique basée aux Etats-Unis dans le Massachusetts. L'objectif de la société est d'aider les patients à combattre le cancer grâce à des immunothérapies virales oncolytiques. Les virus modifiés par Candel sont conçus pour induire la mort cellulaire par cytotoxicité virale directe dans les cellules cancéreuses, libérant ainsi des néo-antigènes tumoraux tout en créant un microenvironnement pro-inflammatoire au site d'injection. Candel a mis en place deux plateformes d'immunothérapie virale au stade clinique basées sur de nouvelles constructions génétiques d'adénovirus et de HSV.

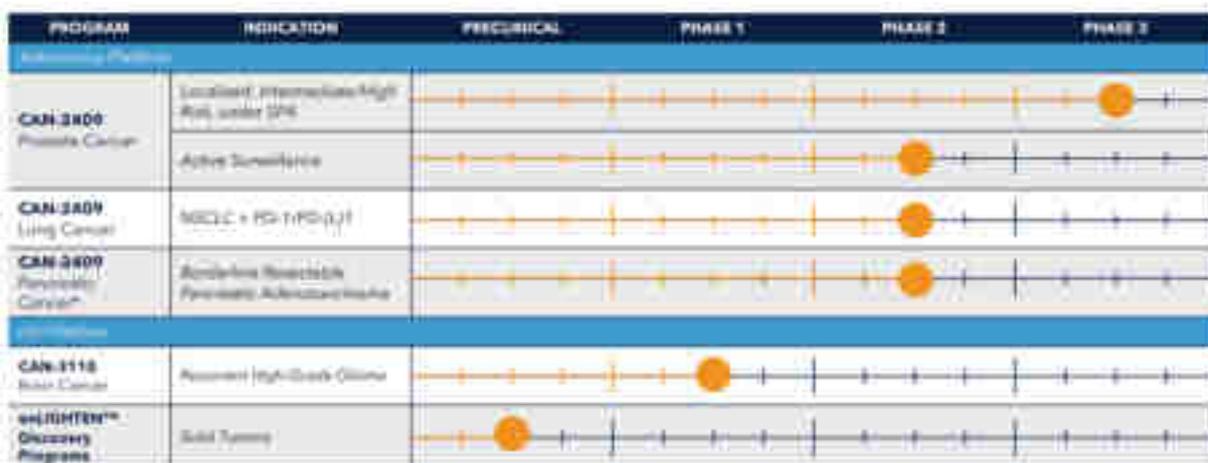


Figure 36 : Portefeuille clinique de la société Candel

Le CAN-2409 est le principal produit candidat de la plateforme adénovirus, il est inclus dans trois indications différentes et le CAN-3110 est le principal produit candidat de la plateforme HSV. Une nouvelle plateforme a également été créée récemment, enLIGHTEN™ qui est basée sur le HSV et s'appuie sur la biologie humaine pour créer de nouvelles immunothérapies virales telles que les cellules CAR-T pour les tumeurs solides. Les différentes plateformes et candidats médicaments sont résumés Figure 36 (76).

A. Adénovirus

L'adénovirus humain (AdV) est un virus non enveloppé composé d'ADN double brin de 36 kb qui appartient à la famille des *Adenoviridae* du genre *Mastadenovirus* (77). Leur génome est non segmenté codant pour 35 protéines dont 11 protéines structurales qui forment la capsid virale. Les AdV sont pathogènes pour l'Homme et provoquent un nombre important d'infections respiratoires, entériques et oculaires aiguës (78). Les symptômes peuvent être non visibles ou bénins pour les personnes en bonne santé (pharyngites, conjonctivites etc.) mais les AdV peuvent aussi entraîner des complications graves telles qu'une pneumonie sévère pouvant parfois être mortelle chez les adultes immunodéprimés ou les jeunes enfants (77).

Le cycle de l'AdV est proche de celui de l'HSV-1. En effet, il possède un cycle répliatif dans le noyau et la transcription de la majorité de ses gènes est réalisée par l'ARN polymérase II de la cellule hôte. Les virions peuvent être libérés plusieurs jours après l'infection, ce qui rend le cycle répliatif plutôt lent. Les AdV se divisent en 7 espèces classées en fonction de leur tropisme (de A à G) avec plus de 50 sérotypes et 70 génotypes distincts (77). Les espèces B, C et E infectent le tractus respiratoire, B et D la conjonctive et A, F et G le tractus gastro-intestinal (79).

En 2006, la Chine a approuvé la première thérapie virale oncolytique avec un AdV : la souche H101 dérivée du candidat Onyx-015 pour le traitement du carcinome nasopharyngé. Onyx-015 est un AdV délété d'un gène afin de devenir sélectif des cellules tumorales déficientes en p53. Mais il s'est avéré qu'il ne faisait pas preuve d'autant de spécificité envers les cellules tumorales. La souche H101 a donc été créée, en étant plus sélective des cellules tumorales grâce à une autre voie génomique activée. Le virus ne peut donc plus se répliquer dans les cellules saines (80). Cependant, le développement du virus n'a pas été étendu hors de Chine (81).

B. Armement et mécanisme d'action

CAN-2409 consiste en un adénovirus non répliatif armé de la thymidine kinase du HSV qui métabolise le valaciclovir en un nucléotide phosphorylé (aciclovir) qui est incorporé dans l'ADN de la cellule tumorale, infligeant ainsi la mort immunogène des cellules cancéreuses (Figure 37). Le valaciclovir est un antiviral prescrit dans le traitement de zona, herpès labial ou génital (82).

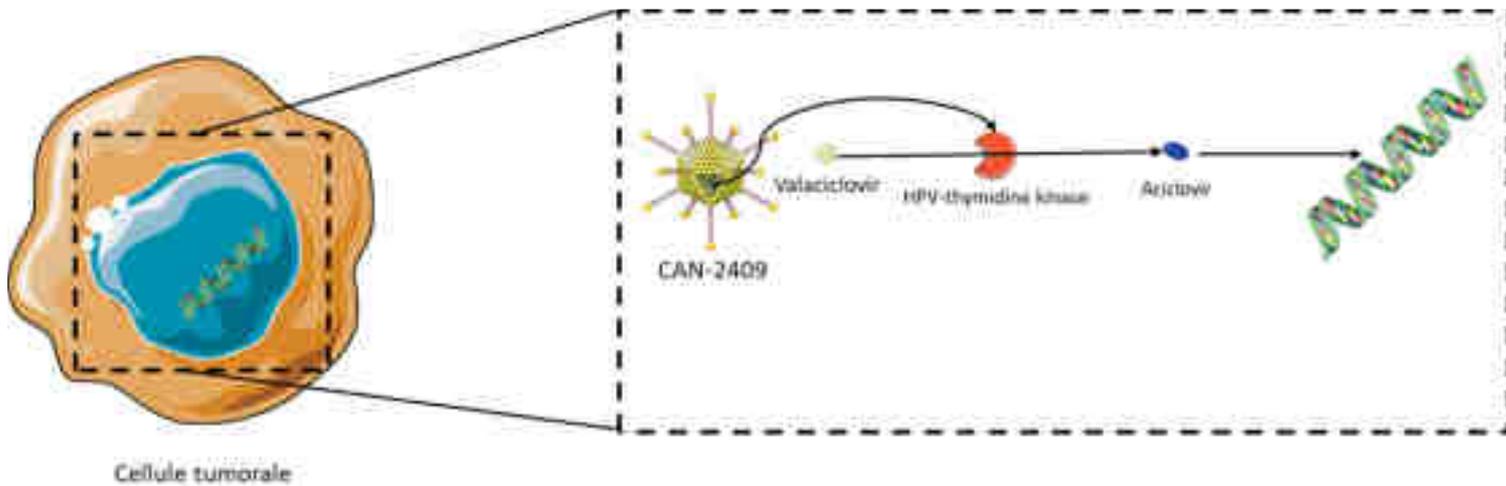


Figure 37 : Mécanisme d'action de CAN-2409

L'adénovirus est injecté localement dans la tumeur permettant sa pénétration dans les cellules tumorales plus facilement, puis le valaciclovir est administré par voie orale. CAN-2409 va retourner la machinerie cellulaire de l'hôte pour produire la thymidine kinase de l'herpès présente dans son génome, ce qui va permettre de transformer le valaciclovir en nucléotide toxique pour l'ADN cellulaire en division. Il a été observé que les cellules exposées à ce nucléotide toxique dans le microenvironnement tumoral subissent une mort cellulaire immunogène. En même temps, la protéine de capsid adénovirale induit un fort signal pro-inflammatoire dans le microenvironnement tumoral. Cela crée les conditions optimales pour induire une réponse médiée par les LT CD8 spécifiques contre la tumeur injectée et les métastases distantes non injectées pour une activité antitumorale large et systémique (76).

Les données concernant la méthode d'armement dans le génome du virus n'ont pas été rendues publiques. Cependant, une étude préclinique évaluant la combinaison du virus avec un anti PD-1 est parue en 2018 (83). Le CAN-2409 est injecté en IT suivi de l'administration du pro-médicament ganciclovir dans des modèles de glioblastome murin. Le but est de démontrer que l'administration d'un anti-PD-1 augmente l'efficacité de CAN-2409 ainsi que les réponses antitumorales des LT. Des lignées cellulaires de glioblastomes de souris ont été infectées avec une dose croissante de CAN-2409 en présence ou en absence de ganciclovir. Le virus a un effet dose dépendant, combiné au ganciclovir et induit une mort tumorale significative comme on peut le voir à gauche de la Figure 38. De plus, l'expression de PD-L1 dans les lignées cellulaires de glioblastome après infection est très augmentée et augmente en fonction des jours (graphique de gauche de la Figure 38). Ces observations ont également été observées par la suite *in vivo*.

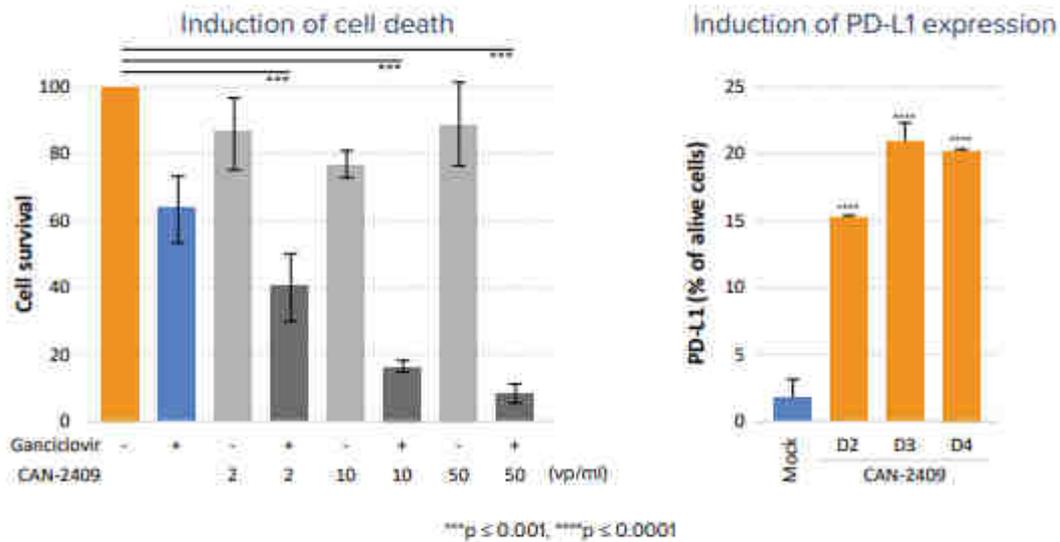


Figure 38 : Effets cytotoxiques et induction de PD-L1 par CAN-2409 dans les lignées cellulaires de glioblastome

Pour tester l'efficacité du CAN-2409 combiné au blocage du point de contrôle immunitaire PD-1, une étude de survie a été réalisée en utilisant des cellules des lignées précédemment mentionnées implantées de manière intracrânienne chez des souris syngéniques C57BL/6. Sept jours après l'implantation de la tumeur, CAN-2409 est injecté en IT suivie d'une administration de ganciclovir. Dix jours après, un anticorps anti-PD-1 est administré. Les résultats sont détaillés Figure 39.

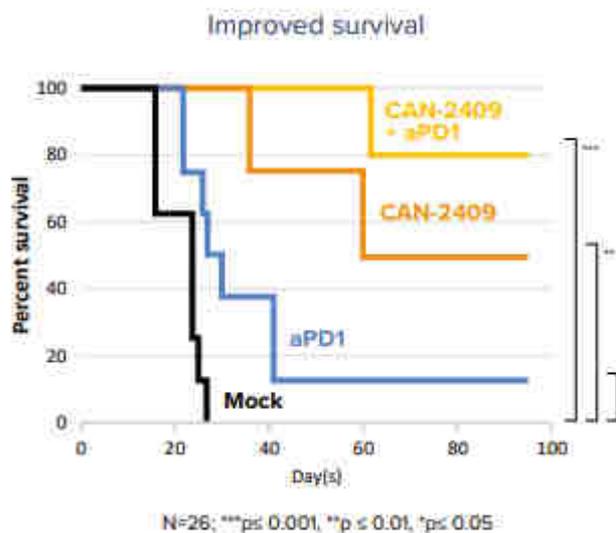


Figure 39 : Pourcentage de survie du modèle murin après injection de CAN-2409 +/- l'anticorps anti-PD-L1

Aucun animal non traité n'a survécu au-delà du jour 30 et la combinaison de virus et de l'anticorps anti-PD-1 a donné lieu à 80 % de survie. Il semblerait donc intéressant de combiner les deux lors d'essais cliniques.

Récemment, en 2023, une autre étude de ce candidat utilisant des souris a été publiée (84). Le but est d'obtenir une caractérisation de l'impact du CAN-2409 sur le transcriptome (ensemble des ARN). Cette recherche a utilisé des modèles *in vivo* et *in vitro* de glioblastome pour comprendre les interactions entre CAN-2409 et le microenvironnement tumoral. L'étude a révélé que le CAN-2409 est associé à la régulation à la baisse de voies spécifiques, telles que la signalisation p53 dans les modèles *in vitro* et la signalisation du cycle cellulaire dans les modèles *in vivo*. Les analyses des profils d'expression des cytokines ont également indiqué une régulation à la hausse de l'IL12. Comme montré Figure 40, une augmentation significative de l'IL12 et l'IL6 est observée après administration du CAN-2409 (cadran de droite du graphique à point).

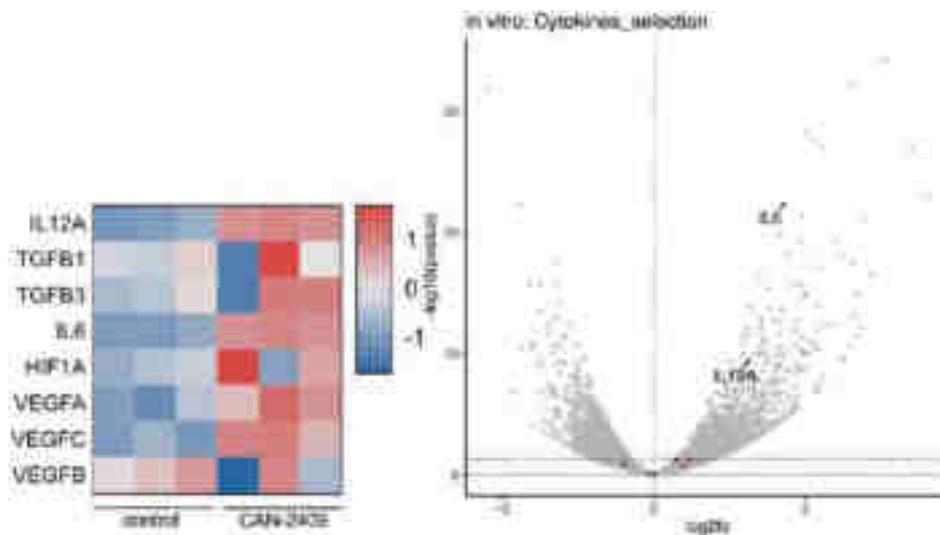


Figure 40 : Expression des cytokines *in vitro* après traitement au CAN-2409 par rapport au contrôle

Le microenvironnement du glioblastome est connu pour sa forte concentration de cellules myéloïdes, en particulier de macrophages. Les macrophages associés à la tumeur dans ce microenvironnement contribuent à la nature agressive du glioblastome en sécrétant des facteurs pro-tumorigènes. Une étude est alors menée sur l'expression *in vivo* des caractéristiques des cellules immunitaires comme le CD4. Les résultats pour les macrophages est visible Figure 41.

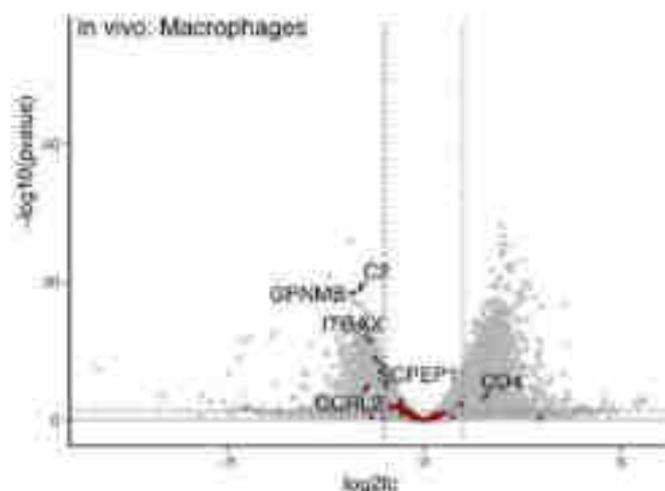


Figure 41 : Expression des gènes associés aux macrophages après traitement au CAN-2409

Après traitement par CAN-2409, il est observé une réduction significative du nombre de macrophages associés à la tumeur, avec une faible présence des marqueurs spécifiques. Cela indique le potentiel du virus à influencer positivement le microenvironnement de la tumeur.

Pris ensemble, les résultats de l'étude démontrent que le CAN-2409 modifie de manière significative le transcriptome des cellules tumorales (principalement par p53 et sur la signalisation du cycle cellulaire). De plus, cette altération est encore plus influencée par son interaction avec le microenvironnement tumoral. Ces changements dans le transcriptome induits par le CAN-2409 sont considérés comme un facteur majeur contribuant à son efficacité à tuer les cellules tumorales.

CAN-2409 est donc un candidat prometteur influençant le transcriptome ainsi que le microenvironnement tumoral tout en étant possible de le combiner avec un inhibiteur de point de contrôle pour amplifier son effet oncolytique. Des premiers essais cliniques de ce candidat sont sortis rapidement pour plusieurs indications. Les résultats cliniques vont être présentés dans la partie suivante.

C. Résultats cliniques

CAN-2409 est actuellement inclus dans trois essais cliniques différents pour traiter trois types de cancers : le cancer de la prostate, le cancer pancréatique et le cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC). Avant ces indications, le CAN-2409 a été testé dans le gliome à haut grade en association avec le nivolumab (85) mais en raison d'une activité clinique plus prometteuse, la décision a été prise fin 2022, de donner la priorité au CAN-3110 dans le gliome à haut grade et de ne pas poursuivre l'essai clinique de phase III du CAN-2409 pour cette indication (86).

CAN-3110 (rQNestin34.5v2) exprime sélectivement ICP34.5, un gène clé dans la réplication du HSV, dans les cellules tumorales qui surexpriment la nestine, une protéine du cytosquelette. La nestine est fortement exprimée dans les cellules de gliome et d'autres tissus tumoraux, mais elle est absente dans les cellules du cerveau adulte sain. Comparé aux virus de Replimune et au T-vec qui sont délétés du gène ICP34.5, CAN-3110 se réplique dans les cellules de gliome malin bien au-dessus des niveaux observés avec les virus délétés ICP34.5 (87). Ce candidat médicament a démontré un nombre important de réponses durables chez les patients atteints de gliome de haut grade qui ont connu une progression de la maladie après un traitement standard antérieur. Il est actuellement en phase clinique Ib et est bien toléré sans qu'aucune toxicité limitant la dose n'ait été observée.

Après cette nouvelle stratégie, CAN-2409 est donc encore inclus dans trois essais cliniques différents (88) :

Cancer de la prostate

Cette indication est séparée en deux essais : le premier est de phase III randomisé, contrôlé par placebo et évalue le traitement CAN-2409 en injection IT en association avec le valaciclovir ajouté à la radiothérapie externe standard pour les patients atteints d'un cancer localisé de la prostate, par rapport à

la radiothérapie standard de soins seule. L'essai a recruté 711 patients et les résultats sont prévus pour le quatrième trimestre 2024.

Le deuxième essai est de phase II en surveillance active avec injection de CAN-2409 et valaciclovir en comparaison avec une injection de placebo. L'essai a inclus 187 patients et la lecture des résultats est prévue quatrième semestre 2023.

Cancer du poumon non à petites cellules 2021

Il s'agit d'un essai clinique de phase II à plusieurs bras visant à évaluer le CAN-2409 associé au valaciclovir et à une thérapie anti-PD-L1 chez les patients atteints d'un CPNPC de stade III/IV. Ces patients présentaient une réponse inadéquate aux inhibiteurs de points de contrôle. L'essai est toujours en cours de recrutement, pour le moment 52 patients ont été inclus. Il a été observé une diminution de la taille des lésions chez la plupart des patients ainsi que des lésions tumorales non injectés (67%). Le taux de réponse globale est de 13% et le taux de contrôle de la maladie est de 77% chez les patients entrant dans l'essai avec une maladie en progression.

Pancréas

L'essai clinique est de phase II intégrant le CAN-2409 et le valaciclovir chez des sujets atteints d'un cancer du pancréas limite résecable et traités par chimioradiation néoadjuvante ou par radiothérapie corporelle stéréotaxique. L'ajout de CAN-2409 et valaciclovir commence après avoir terminé au moins 4 mois d'un traitement d'induction à base de FOLFIRINOX (chimiothérapie contenant le 5-FU, de l'acide folique pour limiter les effets du 5-FU, l'irinotecan, un inhibiteur de topoisomérase et de l'oxaliplatine, un agent antinéoplasique). Les résultats préliminaires sont attendus pour début 2024.

En conclusion, la totalité des données cliniques démontre que le CAN-2409 et le CAN-3110 sont des immunothérapies virales expérimentales actives avec des réponses immunitaires locales et systémiques. Les résultats semblent prometteurs et sont attendus pour 2024-2025 avant une potentielle mise sur le marché.

CONCLUSION

Le cancer est une maladie complexe et répandue dont aucun traitement curatif fiable n'a encore vu le jour. Par leur nature variable et peu connue, les cellules cancéreuses sont uniques et propres à chaque individu. Des caractéristiques communes sont tout de même présentes comme leur réplication illimitée, l'échappement au système immunitaire ou encore leur échappement à des signaux cellulaires. Les traitements actuels jouent sur ces caractéristiques pour essayer de combattre cette maladie mais des améliorations sont encore à apporter, en particulier sur les effets secondaires souvent sévères associés à ces traitements.

Des traitements employant de nouvelles technologies voient le jour comme les thérapies ciblées de plus en plus précises ou les immunothérapies. En effet, le combat des cellules cancéreuses passe également par le système immunitaire qui va aider les thérapies directes à être plus compétentes. Parmi les immunothérapies récentes, les virus oncolytiques sont des candidats intéressants dans la lutte contre le cancer. Ce sont des agents pathogènes pouvant infecter et tuer des cellules tout en alarmant le système immunitaire. Bien modulé, ils pourraient devenir une arme efficace contre ces cellules anormales. Un seul virus oncolytique a obtenu une AMM pour le moment et de nombreux sont en essais cliniques. C'est le cas de TG6002 et BT-001, deux VV en essai clinique de phase I avec des résultats prometteurs pour la suite. Ces virus sont délétés de deux gènes codant pour des protéines, TK et RR, nécessaires dans la synthèse et la réparation de l'ADN. Ils ne pourront alors se répliquer que dans les cellules ayant un nombre anormalement élevé de nucléotides, nécessaire à la création de virions. TG6002 a ensuite été armé avec des gènes permettant la conversion du promédicament 5-FC en 5-FU toxique, tandis que BT-001 possède un armement composé d'un anticorps anti-CTLA4 et de la cytokine GM-CSF. Après infections sélectives des cellules cancéreuses, ces modifications vont permettre d'augmenter l'effet toxique local et de ramener les cellules du système immunitaire au site tumoral. Les résultats cliniques sont encourageants et la suite des phases cliniques devraient continuer dans les années à venir.

Pour produire ce type de médicaments qui seront injectés aux humains, des conditions particulières sont nécessaires. En effet le virus étant d'une taille trop élevée pour passer la filtration stérilisante recommandée par les autorités de la santé pour tous médicaments injectables, une autre approche a dû être établie. Le processus de fabrication est donc entièrement aseptique ce qui entraîne des conditions exigeantes pour la production du produit : un habillage spécifique, des locaux conçus pour réduire au maximum les contaminations, des contrôles environnementaux réguliers, des habilitations du personnels, des qualifications de chaque équipements utilisés... Tout est dicté par les BPF afin de garantir la qualité du produit et sécuriser au maximum le patient.

Les étapes de fabrication des virus se déroulent durant plusieurs semaines. Tout d'abord une préparation cellulaire est réalisée pour obtenir des cellules primaires, elles seront ensuite infectées afin d'amplifier le virus. La suspension obtenue passe ensuite par un cassage mécanique pour détruire les cellules et libérer le virus, puis une clarification et une purification par flux tangentielle se déroulent pour isoler le produit. Il sera ensuite réparti dans des flacons pour être envoyé sur site clinique.

Les deux virus présentés faisant partie de la plateforme invir.IO® de Transgene sont loin d'être les seuls en développement d'un nouveau traitement révolutionnaire contre le cancer, la concurrence est rude. Replimune et Candellion sont deux entreprises parmi d'autres qui misent sur les virus oncolytiques. Replimune a fait le choix du HSV-1 pour développer ses candidats médicaments. Il a été délété de plusieurs gènes diminuant sa réplication puis armé par des gènes codant pour des inhibiteurs de checkpoint et des cytokines. Trois produits sont actuellement en phase clinique I et II et les résultats sont attendus pour fin d'année 2023. Candellion a fait le choix des adénovirus et de l'HSV également. Le candidat principal de la plateforme adénovirus est armé de la HSV-thymidine kinase, qui métabolise le valaciclovir en un nucléotide phosphorylé toxique. Le virus injecté en IT va permettre de transformer localement le valaciclovir en nucléotide directement au niveau de l'ADN tumoral, bloquant sa réplication.

À la suite de l'étude de ces deux entreprises, les espèces virales étudiées pour trouver un nouveau traitement sont multiples et ont chacune leurs avantages : le VV est le plus étudié et est un virus de grande taille donc il peut transporter de grandes quantités de matériel génétique étranger, ce qui permet l'expression de plusieurs transgènes. Les HSV peuvent établir une latence au sein de l'hôte, ce qui entraîne une expression à long terme de l'antigène et des réponses immunitaires potentiellement prolongées et les adénovirus peuvent infecter un large éventail de types de cellules, ce qui les rend aptes à transmettre du matériel génétique à divers tissus. Cependant, il y a également des limites : pour les VV, malgré une pathogénicité diminuée par délétion de gène, la manipulation et la fabrication du virus nécessitent des installations spécialisées et des précautions pour éviter les infections accidentelles (principalement des risques de piqûres ou des risques oculaires). Pour les HSV, le risque de réactivité dû à sa capacité de latence peut survenir et provoquer une réactivation virale tardive. Pour finir, les adénovirus sont de moins en moins étudiés car ils se propagent lentement, ils ont une capacité limitée à exprimer des gènes et ils diffusent plus difficilement lors d'une administration intraveineuse (89).

Ce ne sont d'ailleurs pas les seules espèces existantes en développement cliniques, mais ce sont les principales qui sont les plus avancées en phase clinique. Un état des lieux des différents essais concernant les VV et les HSV sont présents en Annexe 1.

En conclusion, les traitements anticancéreux sont au cœur de nombreuses réflexions avec l'apparition de nouvelles technologies pour essayer d'arriver à soigner cette maladie. De nouvelles approches apparaissent encore comme les ARNm qui suscitent beaucoup d'intérêt depuis le vaccin contre le SARS-CoV-2. Les vaccins anticancéreux à ARNm présentent plusieurs avantages, tels qu'une production rapide et à grande échelle, une flexibilité, une toxicité contrôlée et la capacité de provoquer une réponse immunitaire protectrice robuste. Surtout, les vaccins à ARNm ne comportent pas le risque de s'intégrer dans le génome de l'hôte, ce qui en fait une modalité thérapeutique prometteuse (90). Les efforts mondiaux sur ces différents sujets, que ce soit les virus oncolytiques, les ARNm ou d'autres sujets encore en développement, vont, je l'espère, permettre de trouver un nouvel élan pour venir à bout de cette maladie.

BIBLIOGRAPHIE

1. Institut National du Cancer. Qu'est ce que le cancer? [Internet]. [cité le 29 juillet 2023]. Disponible sur <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Qu-est-ce-qu-un-cancer>.
2. Transgene. Portefeuille des produits. [Internet]. [cité le 29 juillet 2023]. Disponible sur <https://www.transgene.fr/>.
3. Transgene - Communiqué de presse sur l'essai TG6050 [Internet]. [cité le 12 août 2023]. Disponible sur https://www.transgene.fr/wp-content/uploads/20230510_Transgene_TG6050_Delivir_trial_FPI_FR.pdf.
4. Hajdu SI. A note from history: Landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer*. 1 mars 2011;117(5):1097-102.
5. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. janv 2000;100(1):57-70.
6. Turner KJ, Vasu V, Griffin DK. Telomere Biology and Human Phenotype. *Cells*. 19 janv 2019;8(1):73.
7. Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell*. 7 mars 2019;176(6):1248-64.
8. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. mars 2011;144(5):646-74.
9. Murphy K, Weaver C, Berg L. Janeway's. *Immunobiology*. 10th edition. W. W. Norton & Company ; 2022 ; p.94, 912, 1744.
10. Pradeu T, Cooper EL. The danger theory: 20 years later. *Front Immun* [Internet]. 2012 [cité 4 févr 2023];3. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2012.00287/abstract>
11. Institut Curie. Caractérisation de la réponse lymphocytaire T. [Internet]. [cité le 18 avril 2023]. Disponible sur <https://curie.fr/popin/caracterisation-de-la-reponse-lymphocytaire-t-aux-neo-antigenes-dans-trois-types-de-cancer#:~:text=Lorsqu'une%20cellule%20devient%20canc%3%A9reuse,des%20%C2%AB%20n%3%A9o%2Dantig%3%A8nes%20%C2%BB>.
12. Chen DS, Mellman I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity*. juill 2013;39(1):1-10.
13. Cao J, Yan Q. Cancer Epigenetics, Tumor Immunity, and Immunotherapy. *Trends in Cancer*. juill 2020;6(7):580-92.
14. Gael S. Roth, Zuzana Macek-Jilkova, Thomas Decaens. Immunologie dans le carcinome hépatocellulaire : bases physiopathologiques et cibles thérapeutiques. *Hépatogastro & Oncologie Digestive*. 2020;27(1):26-34. doi:10.1684/hpg.2020.1947.
15. Institut National du Cancer. Traitements contre le cancer. [Internet]. [cité le 18 avril 2023]. Disponible sur : <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Se-faire-soigner/Traitements>.
16. Etienne Selloum, Faure N Sébastien. Du mécanisme d'action des médicaments à la thérapeutique. 1ère éd. Elsevier Masson ; 2015 ; p382-8.

17. Teillaud JL. L'immunothérapie des cancers couronnée avec l'attribution du prix Nobel de Physiologie ou Médecine à James Allison et Tasuku Honjo. *Med Sci (Paris)*. avr 2019;35(4):365-6.
18. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *American Journal of Clinical Oncology*. févr 2016;39(1):98-106.
19. Dagher OK, Schwab RD, Brookens SK, Posey AD. Advances in cancer immunotherapies. *Cell*. avr 2023;186(8):1814-1814.e1.
20. Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell*. févr 2017;168(4):707-23.
21. Catros V. Les *CAR-T cells*, des cellules tueuses spécifiques d'antigènes tumoraux: De nouvelles générations pour le traitement des tumeurs solides. *Med Sci (Paris)*. avr 2019;35(4):316-26.
22. Delaunay T. Étude de différents virus oncolytiques pour l'immunothérapie du cancer: Mécanismes de la sensibilité tumorale et effets sur la réponse immunitaire. Thèse de doctorat, Nantes, 2018.
23. McCarthy EF. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop J*. 2006;26:154-158.
24. Pol J, Le Bœuf F, Diallo JS. Stratégies génétiques, immunologiques et pharmacologiques au service d'une nouvelle génération de virus anticancéreux. *Med Sci (Paris)*. févr 2013;29(2):165-73.
25. Guo ZS, Lu B, Guo Z, Giehl E, Feist M, Dai E, et al. Vaccinia virus-mediated cancer immunotherapy: cancer vaccines and oncolytics. *J immunotherapy cancer*. déc 2019;7(1):6.
26. Sarlangue J. Histoire des vaccinations, de la variole à la Covid-19. *Perfectionnement en Pédiatrie*. mars 2022;5(1):72-83.
27. Sánchez-Sampedro L, Perdiguero B, Mejías-Pérez E, García-Arriaza J, Di Pilato M, Esteban M. The Evolution of Poxvirus Vaccines. *Viruses*. 7 avr 2015;7(4):1726-803.
28. Tartaglia J, Perkus ME, Taylor J, Norton EK, Audonnet JC, Cox WI, Davis SW, van der Hoeven J, Meignier B, Riviere M, et al. NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology*. 1992 May;188(1):217-32.
29. Foloppe J, Kempf J, Futin N, Kintz J, Cordier P, Pichon C, et al. The Enhanced Tumor Specificity of TG6002, an Armed Oncolytic Vaccinia Virus Deleted in Two Genes Involved in Nucleotide Metabolism. *Molecular Therapy - Oncolytics*. sept 2019;14:1-14.
30. Blázquez-Bermejo C, Molina-Granada D, Vila-Julià F, Jiménez-Heis D, Zhou X, Torres-Torronteras J, et al. Age-related metabolic changes limit efficacy of deoxynucleoside-based therapy in thymidine kinase 2-deficient mice. *EBioMedicine*. août 2019;46:342-55.
31. Semmrich M, Marchand JB, Fend L, Rehn M, Silvestre N, Foloppe J, et al. BT-001, an oncolytic vaccinia virus armed with a Treg-depleting anti-CTLA-4 antibody and GM-CSF to target the tumor microenvironment. Poster présenté au SITC, 10-15 novembre 2020.
32. Erbs P., Regulier E., Kintz J., Leroy P., Poitevin Y., Exinger F., et al. In vivo cancer gene therapy by adenovirus-mediated transfer of a bifunctional yeast cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase fusion gene. *Cancer Res*. 2000; 60: 3813-3822.

33. Blondy S, David V, Verdier M, Mathonnet M, Perraud A, Christou N. 5-Fluorouracil resistance mechanisms in colorectal cancer: From classical pathways to promising processes. *Cancer Science*. sept 2020;111(9):3142-54.
34. Breitbach CJ, Arulanandam R, De Silva N, Thorne SH, Patt R, Daneshmand M, Moon A, Ilkow C, Burke J, Hwang TH, Heo J, Cho M, Chen H, Angarita FA, Addison C, McCart JA, Bell JC, Kirn DH. Oncolytic vaccinia virus disrupts tumor-associated vasculature in humans. *Cancer Res*. 2013 Feb 15;73(4):1265-75.
35. Tartour É, Sandoval F, Bonnefoy JY, Fridman WH. Immunothérapie des cancers: Succès récents et perspectives. *Med Sci (Paris)*. oct 2011;27(10):833-41.
36. Becher B, Tugues S, Greter M. GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation. *Immunity*. nov 2016;45(5):963-73.
37. Leem. Quel est le rôle de la recherche clinique ? [Internet]. [cité le 20 avril 2023]. Disponible sur <https://www.leem.org/100-questions/quel-est-le-role-de-la-recherche-clinique>.
38. Inserm. Les essais cliniques (Recherches interventionnelles portant sur un produit de santé). [Internet]. [cité le 20 avril 2023]. Disponible sur <https://www.inserm.fr/nos-recherches/recherche-clinique/essais-cliniques-recherches-interventionnelles-portant-sur-produit-sante/>.
39. Béguin J, Gantzer M, Farine I, Foloppe J, Klonjkowski B, Maurey C, et al. Safety, biodistribution and viral shedding of oncolytic vaccinia virus TG6002 administered intravenously in healthy beagle dogs. *Sci Rep*. 26 janv 2021;11(1):2209.
40. Moreno V, Cassier P, Doger B, Calvo E, Miguel MD, Garcia-Carbonero R, et al. Updated data of biodistribution and activity of oncolytic virus TG6002 after intravenous administration in patients with advanced gastrointestinal carcinomas. Poster présenté à l'ESMO 09-13 septembre 2022, Paris.
41. Transgene - Communiqué de presse sur les données de Phase I de TG6002. [Internet]. [cité le 21 avril 2023]. Disponible sur https://www.transgene.fr/wp-content/uploads/Transgene_Communique-Press-TG6002-ESMO-Poster_FR.pdf. 2019.
42. Samson A, Smolenschi C, Cassier P, Patel JV, Hammond C, Kurzawa M, et al. Oncolytic virus TG6002 safety and activity after intrahepatic artery administration in patients with liver-dominant metastatic colorectal cancer. Poster présenté à l'AAACR, 14-19 avril 2023, Orlando.
43. Semmrich M, Marchand JB, Fend L, Rehn M, Remy C, Holmkvist P, et al. Vectorized Treg-depleting α CTLA-4 elicits antigen cross-presentation and CD8⁺ T cell immunity to reject 'cold' tumors. *J Immunother Cancer*. janv 2022;10(1):e003488.
44. Clinical Trial. BT-001 Alone and in Combination With Pembrolizumab in Metastatic or Advanced Solid Tumors. [Internet]. [cité le 02 janvier 2023]. Disponible sur <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04725331>.
45. Transgene - Communiqué de presse sur les avancées positives de BT-001. [Internet]. [cité le 02 janvier 2023]. Disponible sur https://www.transgene.fr/wp-content/uploads/20220627-Transgene_BioInvent_BT-001_clinical_update-FR.pdf.
46. ANSM - Guide des Bonnes Pratiques de Fabrication - août 2023. [Internet]. [cité le 26 aout 2023]. Disponible sur <https://ansm.sante.fr/documents/referance/bonnes-pratiques-de-fabrication-de-medicaments-a-usage-humain>.

47. EudraLex GMP - Annex 1 - Volume 4. [Internet]. [cité le 26 août 2023]. Disponible sur https://health.ec.europa.eu/system/files/2022-08/20220825_gmp-an1_en_0.pdf
48. Dupont. Vêtements et Accessoires pour environnements contrôlés. [Internet]. [cité le 27 mai 2023]. Disponible sur : <https://www.dupontdenemours.fr/personal-protection/controlled-environments-apparel-accessories.html>.
49. Balty I, Belhanini B, Clermont H, Cornu JC, Jacquet MA, Teste JC. Postes de sécurité microbiologique, postes de sécurité cytotoxique. INRS N°193 ; 2023 ; p.37.
50. Grugier J, Gatefin B. La filtration tangentielle en bioproduction. La Vague 4ème éd ; 2014 ; p.25.
51. Direction Européenne de la qualité du médicament et des soins de santé, «Pharmacopée Européenne 11.2, Chapitre 2.9.20 », 2023.
52. Maruyama Y, Sakurai A, Noda S, Fujiwara Y, Okura N, Takagi T, et al. Regulatory Issues: PMDA – Review of Sakigake Designation Products: Oncolytic Virus Therapy with Delytact Injection (Tesperaturev) for Malignant Glioma. *The Oncologist*. 3 août 2023;28(8):664-70.
53. Liang M. Oncorine, the World First Oncolytic Virus Medicine and its Update in China. *Curr Cancer Drug Targets*. 2018;18(2):171-176.
54. Alberts P, Tilgase A, Rasa A, Bandere K, Venskus D. The advent of oncolytic virotherapy in oncology: The Rigvir® story. *Eur J Pharmacol*. 2018 Oct 15;837:117-126.
55. Replimune. Pipeline. [Internet]. [cité le 24 juin 2023]. Disponible sur <https://replimune.com/pipeline/>.
56. Kukhanova MK, Korovina AN, Kochetkov SN. Human herpes simplex virus: Life cycle and development of inhibitors. *Biochemistry Moscow*. déc 2014;79(13):1635-52.
57. Aranda AM, Epstein AL. Latence et réactivation du virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1): Une mise à jour. *Med Sci (Paris)*. mai 2015;31(5):506-14.
58. Saha D, Wakimoto H, Rabkin SD. Oncolytic herpes simplex virus interactions with the host immune system. *Current Opinion in Virology*. déc 2016;21:26-34.
59. Li Y, Zhang C, Chen X, Yu J, Wang Y, Yang Y, et al. ICP34.5 Protein of Herpes Simplex Virus Facilitates the Initiation of Protein Translation by Bridging Eukaryotic Initiation Factor 2 α (eIF2 α) and Protein Phosphatase 1. *Journal of Biological Chemistry*. juill 2011;286(28):24785-92.
60. Fukuhara H, Ino Y, Todo T. Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn. *Cancer Sci*. oct 2016;107(10):1373-9.
61. Thomas S, Kuncheria L, Roulstone V, Kyula JN, Mansfield D, Bommareddy PK, et al. Development of a new fusion-enhanced oncolytic immunotherapy platform based on herpes simplex virus type 1. *J immunotherapy cancer*. déc 2019;7(1):214.
62. Cheuk ATC, Mufti GJ, Guinn B ann. Role of 4-1BB:4-1BB ligand in cancer immunotherapy. *Cancer Gene Ther*. 1 mars 2004;11(3):215-26.
63. Clinical trial CERPASS - Replimune [Internet]. [cité le 15 juillet 2023]. Disponible sur <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04050436>.
64. Replimune - Report fiscal fourth quarter and year ended 2023 financial results and provides corporate update. [Internet]. [cité le 15 juillet 2023]. Disponible sur :

https://www.sec.gov/Archives/edgar/data/1737953/000110465923062103/tm2316116d2_ex99-1.htm.

65. Harrington K, Nenclares P, Leslie I, VanderWalde A, Bowles T, Sacco J, et al. 610 Immune biomarker analysis of RP1 in combination with nivolumab in patients with advanced solid tumors. In: Regular and Young Investigator Award Abstracts [Internet]. BMJ Publishing Group Ltd; 2022 [cité 15 juill 2023]. p. A641-A641. Disponible sur: <https://jitc.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jitc-2022-SITC2022.0610>
66. Globe Newswire. Replimune presents RP1 data from the Ignyte and RP2 data. [Internet]. [cité le 15 juillet 2023]. Disponible sur : <https://www.globenewswire.com/news-release/2023/06/03/2681534/0/en/Replimune-Presents-RP1-Data-from-the-IGNYTE-anti-PD1-Failed-Melanoma-Cohort-and-RP2-Data-in-Uveal-Melanoma-at-the-2023-American-Society-of-Clinical-Oncology-ASCO-Annual-Meeting.html>.
67. Duval A, Hamelin R. Réparation des erreurs de réplication, microsatellites et cancer. *Med Sci (Paris)*. janv 2003;19(1):55-62.
68. Clinical trial ARTACUS - Replimune. [Internet]. [cité le 15 juillet 2023]. Disponible sur <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04349436>.
69. Migden MR, Chai-Ho W, Daniels GA, Davar D, Wise-Draper T, Kheterpal M, et al. Initial results from an open-label, multicenter, phase 1b/2 study of RP1 oncolytic immunotherapy in solid organ and hematopoietic cell transplant recipients with advanced cutaneous malignancies (ARTACUS). Poster présenté à American Transplant Congress, 3-7 juin 2023, San Diego.
70. Sacco JJ, Harrington KJ, Olsson-Brown A, Chan TY, Nenclares P, Leslie I, et al. Preliminary safety and efficacy results from an open-label, multicenter, phase 1 study of RP2 as a single agent and in combination with nivolumab in a cohort of patients with uveal melanoma. *JCO*. 1 juin 2023;41(16_suppl):9527-9527.
71. Shepard DR, Ahmed M, Bekaii-Saab TS, Wolff J, Clinic C. Trial in progress: An open-label clinical trial of RP2 and RP3 oncolytic immunotherapy in combination with atezolizumab and bevacizumab for the treatment of patients with advanced colorectal carcinoma.
72. Vidal - Mécanisme d'action du Bevacizumab [Internet]. [cité le 29 juillet 2023]. Disponible sur <https://www.vidal.fr/medicaments/substances/bevacizumab-22676.html>.
73. Harrington KJ, Cohen E, Zandberg DP, Day TA, Geiger JL, Oliva M, et al. Trial in progress: A phase 2, open-label, multicenter study investigating efficacy and safety of RP3 oncolytic immunotherapy combined with other therapies in patients with locoregionally advanced or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. Poster présenté à l'ASCO, 2-6 juin 2023, Chicago.
74. Samson A, Bekaii-Saab TS, Yarchoan M, Ahmed M, Boulhabel F, Cohan DM, et al. Trial in progress: An open-label, multicenter study investigating RP3 oncolytic immunotherapy in combination with first- or second-line systemic atezolizumab and bevacizumab in locally advanced unresectable or metastatic hepatocellular carcinoma. Poster présenté à l'EASL, 20-22 avril 2023, Estoril.
75. Harrington KJ, Nenclares P, Rullan A, Barata J, Leslie I, Deighton L, et al. Case report: Complete response in a patient with mucoepidermoid carcinoma of the parotid gland treated with RP2 oncolytic immunotherapy. Poster présenté à l'AHNS, 8-12 juillet 2023, Montréal.
76. Candel Therapeutics - Pipeline. [Internet]. [cité le 30 juillet 2023]. Disponible sur : <https://www.candeltx.com/>.

77. Cook J, Radke J. Mechanisms of pathogenesis of emerging adenoviruses. *F1000Res*. 30 janv 2017;6:90.
78. Nemerow GR, Pache L, Reddy V, Stewart PL. Insights into adenovirus host cell interactions from structural studies. *Virology*. févr 2009;384(2):380-8.
79. Ghebremedhin B. Human adenovirus: Viral pathogen with increasing importance. *European Journal of Microbiology and Immunology*. mars 2014;4(1):26-33.
80. Ries S, Korn WM. ONYX-015: mechanisms of action and clinical potential of a replication-selective adenovirus. *Br J Cancer*. 7 janv 2002;86(1):5-11.
81. Garber K. China Approves World's First Oncolytic Virus Therapy For Cancer Treatment. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 1 mars 2006;98(5):298-300.
82. Vidal - Valaciclovir [Internet]. [cité le 20 mai 2023]. Disponible sur <https://www.vidal.fr/medicaments/gammes/valaciclovir-biogaran-43416.html>.
83. Speranza MC, Passaro C, Ricklefs F, Kasai K, Klein SR, Nakashima H, et al. Preclinical investigation of combined gene-mediated cytotoxic immunotherapy and immune checkpoint blockade in glioblastoma. *Neuro-Oncology*. 22 janv 2018;20(2):225-35.
84. Koch MS, Zdioruk M, Nowicki MO, Hoetker MS, Herbert ZT, Barone F, et al. Uncovering transcriptomic landscape alterations of CAN-2409 in in vitro and in vivo glioma models. *Front Med*. 9 mai 2023;10:1140352.
85. Candel Therapeutics - Complete Enrollment in Phase 1 Clinical Trial of CAN-2409. [Internet]. [cité le 06 aout 2023]. Disponible sur : <https://www.candeltx.com/press-release/candel-therapeutics-completes-enrollment-in-phase-1-clinical-trial-of-can-2409/>.
86. Candel Therapeutics - R&D Day presentations. [Internet]. [cité le 06 aout 2023]. Disponible sur : <https://www.globenewswire.com/news-release/2022/12/06/2568809/0/en/Candel-Therapeutics-R-D-Day-Presentations-Spotlight-its-Advanced-Pipeline-and-Capabilities-to-Develop-Novel-Viral-Immunotherapies-for-Patients-with-Cancer.htm>.
87. E. Antonio Chiocca, Isaac Solomon, Hiroshi Nakashima, Sean Edward Lawler, Daniel Triggs, Abigail Zhang et al. First-in-human CAN-3110 (ICP-34.5 expressing HSV-1 oncolytic virus) in patients with recurrent high-grade glioma. *Journal of Clinical Oncology* 2021 39:15_suppl, 2009-2009.
88. Candel Therapeutics - R&D Day presentation. [Internet]. [cité le 13 aout 2023]. Disponible sur : https://www.candeltx.com/wp-content/uploads/news/R&D_Day_Candel_Therapeutics.pdf.
89. Ferguson MS, Lemoine NR, Wang Y. Systemic Delivery of Oncolytic Viruses: Hopes and Hurdles. *Advances in Virology*. 2012;2012:1-14.
90. Vishweshwaraiah YL, Dokholyan NV. mRNA vaccines for cancer immunotherapy. *Front Immunol*. 14 déc 2022;13:1029069.

Anaëlle PAILLART

Né le 14 mai 1996 à Strasbourg

Conception de virus oncolytiques multifonctionnels dans le traitement du cancer : exemple d'invir.IO®

Soutenu le 13 octobre 2023 à Strasbourg

N° d'ordre : _____

RESUME

Les virus oncolytiques sont en plein développement dans le monde de la biotechnologie. Grâce à leur capacité naturelle d'infection, ils sont modifiés pour cibler préférentiellement les cellules cancéreuses afin de s'y répliquer et de les éliminer. TG6002 et BT-001, deux virus de la vaccine de la plateforme invirIO® de Transgene ont été armés avec des gènes codant pour un pro-médicament ou des anticorps libérés en action locale pour augmenter l'effet oncolytique. Le procédé de fabrication de tels virus doit être réalisé entièrement stérilement et en respectant les normes pharmaceutiques. Les premiers résultats de phase I de ces deux essais cliniques sont prometteurs et peuvent rivaliser avec des entreprises de pointes dans ce domaine qui utilisent d'autres espèces virales comme l'herpès virus ou l'adénovirus.

Mots clés

**VIRUS ONCOLYTIQUE – PRODUCTION – TRAITEMENT - CANCER –
IMMUNOTHERAPIE**

Nom du Directeur de Thèse : Docteur Christophe ANCEL