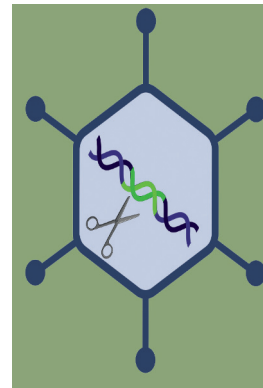


► La mise en évidence de la capacité unique de certains virus à cibler spécifiquement les cellules cancéreuses a ouvert de nouvelles perspectives pour la recherche en immunothérapie des cancers. Outre leur capacité à induire la destruction spécifique des cellules cancéreuses, les virus oncolytiques (OV) ont été modifiés génétiquement pour exprimer des molécules thérapeutiques directement au sein de la tumeur. L'utilisation des OV comme vecteurs de molécules thérapeutiques a permis d'augmenter les réponses anti-tumorales, tout en limitant les effets indésirables liés à une administration par voie générale de ces molécules. D'autres recherches visent aujourd'hui à limiter la neutralisation et l'élimination du virus par le système immunitaire de l'hôte et à améliorer son accès aux tumeurs. ◀

## Les virus oncolytiques : acteurs et vecteurs de protéines thérapeutiques contre les tumeurs

Ana Houel<sup>1,2,3,4</sup>, Johann Foloppe<sup>4</sup>



<sup>1</sup>UMRS 1135 Sorbonne université, Paris, France

<sup>2</sup>Inserm U1135, Paris, France

<sup>3</sup>Équipe « Microenvironnement immunitaire et immunothérapie », centre d'immunologie et des maladies infectieuses (Cimi), faculté de médecine, Sorbonne université, Paris, France

<sup>4</sup>Transgene, Illkirch-Graffenstaden, France

[ana.houel@inserm.fr](mailto:ana.houel@inserm.fr)

cibles, permettant d'obtenir l'adaptation recherchée. Plusieurs passages successifs dans des cellules cancéreuses ont permis d'obtenir des virus affichant un tropisme accru pour ces dernières et/ou une meilleure activité oncolytique. Depuis le début des années 1990, les progrès des techniques de séquençage et d'édition des génomes ont permis de faciliter l'obtention de nouvelles souches recombinantes, plus spécifiques des cellules cancéreuses et, par conséquent, plus sûres pour l'organisme. C'est ainsi qu'en 1999, l'entreprise de biotechnologie *Shanghai Sunway Biotech Co.* a développé le premier OV au monde à être testé dans un essai clinique. Il s'agissait d'un adénovirus modifié, présentant une délétion dans le locus E1B permettant d'augmenter sa spécificité pour les cellules cancéreuses dont le gène *TP53* est muté. Cet adénovirus, nommé Oncorine (H101), obtint l'approbation par la SFDA (*State Food and Drug Administration*) chinoise en 2005 et est actuellement toujours sur le marché chinois [3]. La manipulation génétique des virus a aussi permis d'amplifier leur action anti-tumorale, via l'insertion de transgènes thérapeutiques dans leur génome : ainsi est née une nouvelle génération de virus oncolytiques, les virus oncolytiques « armés ». Talimogene laherparepvec (T-VEC) (Imlygic®) a été le premier OV armé, approuvé par la FDA (*Food and Drug Administration*) américaine en 2015. T-VEC est un virus Herpès simplex de type I (HSV-1) atténué, modifié pour exprimer le facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF), utilisé dans le traitement des mélanomes avancés [4]. Actuellement, plusieurs familles d'OV sont disponibles sur le marché et/ou font encore l'objet de recherches précliniques, dont les adénovirus, les réovirus, les HSV et les poxvirus.

### Un peu d'histoire

Un virus oncolytique (OV) est un virus capable de détruire spécifiquement les cellules cancéreuses. C'est au début des années 1900, chez des patients présentant un cancer associé à une déficience immunitaire, comme la leucémie, que les premières observations furent faites (Figure 1). Certains patients ayant contracté une infection virale comme la grippe [1] ou la varicelle [2] présentèrent au même moment une rémission, *a minima* partielle, de leur cancer. Cette propriété anticancéreuse de certains virus, d'abord observée de façon opportuniste, fût ensuite validée dans des modèles de rongeurs par les travaux de Moore, au milieu du xx<sup>e</sup> siècle. Au vu de leur potentiel thérapeutique, les critères de pathogénicité et d'efficacité furent étudiés avec attention afin de proposer les OV comme nouveau traitement anticancéreux. Avant l'avènement des techniques de bioingénierie moléculaire, ces virus étaient « améliorés » par des infections successives de cellules

Vignette (© Ana Houel).

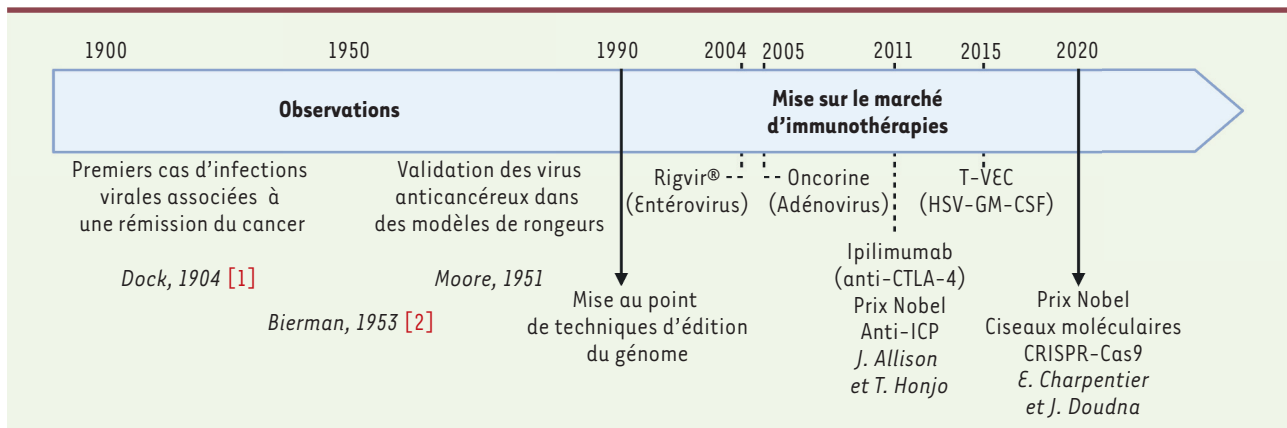


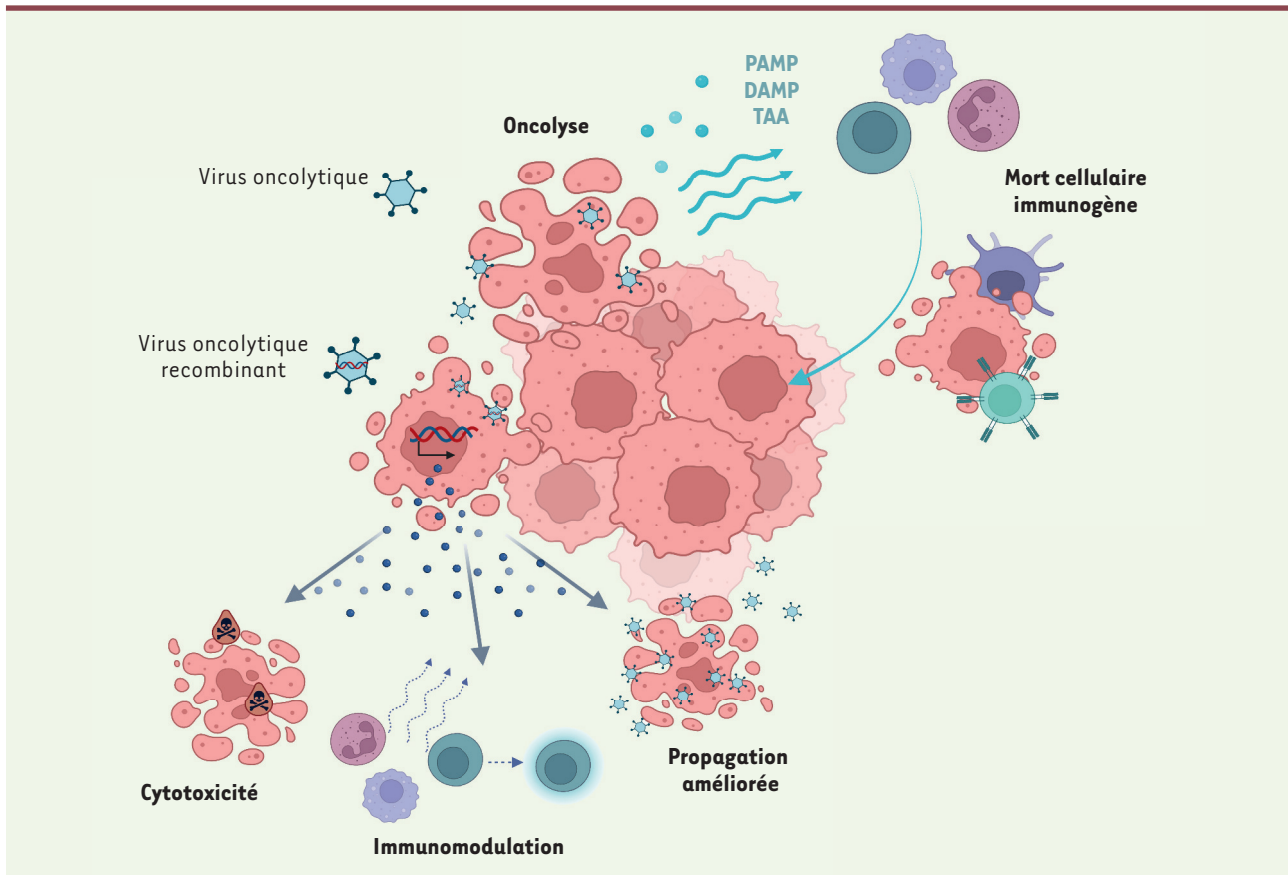
Figure 1. Chronologie de l'utilisation de virus à des fins d'immunothérapie anti-cancéreuse. ICP : Immune CheckPoints.

### Les principes de la virothérapie oncolytique

Les cellules cancéreuses sont généralement déficientes dans leur capacité à développer des réponses anti-virales, lorsqu'elles sont infectées, notamment celles liées aux interférons (IFN) de type I. Cette déficience rend alors les cellules tumorales plus sensibles que les cellules saines aux infections virales, et permet ainsi les thérapies à base d'OV. L'utilisation des OV cible également d'autres caractéristiques des cellules cancéreuses, comme la surexpression de récepteurs cellulaires spécifiques impliqués dans la voie d'entrée des virus dans la cellule hôte, les défauts de gènes suppresseurs de tumeurs ou les gènes impliqués dans les points de contrôle du cycle cellulaire. Bien que, pour ces raisons, les virus ciblent préférentiellement les cellules cancéreuses, l'action des OV n'est cependant pas toujours complètement restreinte à ces dernières. Pour ajouter un verrou à leur sélectivité tumorale, certains OV ont été modifiés génétiquement pour rendre leur cycle viral dépendant de l'environnement d'une cellule tumorale, en inactivant, par exemple, des gènes impliqués dans la biosynthèse de leurs nucléotides, comme le gène codant la thymidine kinase (TK). Les cellules cancéreuses, qui prolifèrent fortement, deviennent alors une source privilégiée en nucléotides pour les virus recombinants, ce qui conduit à une expansion virale ciblée et accrue. L'infection virale entraîne ainsi la régression de la tumeur par deux mécanismes distincts : 1) la destruction directe des cellules tumorales, induite par la réplication virale et, 2) la mort cellulaire immunogène qui stimule les réponses immunitaires anti-tumorales contre toutes les cellules cancéreuses, y compris les cellules non infectées (Figure 2). Cette dernière est déclenchée par le relargage de molécules immunogènes, telles que celles porteuses de motifs moléculaires associés aux dangers (DAMP, pour *damage-associated molecular patterns*) et aux pathogènes (PAMP, pour *pathogen-associated molecular patterns*) qui, une fois reconnus par leurs récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires PRR (*pattern recognition receptor*), conduisent à l'activation de la réponse immunitaire innée. De plus, la libération d'antigènes tumoraux et l'augmentation de l'expression de molécules impliquées dans l'apprêtement et la présentation d'antigènes, participent à l'ac-

tivation de la réponse immunitaire adaptative. Cette modulation du microenvironnement tumoral (TME) par les OV se traduit généralement par la conversion des tumeurs « froides » ou très peu infiltrées par les cellules immunitaires, en tumeurs « chaudes » plus infiltrées, augmentant ainsi leur sensibilité aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaire (ICI). L'administration des OV favorise donc l'activation d'une immunité anti-tumorale qui, combinée à l'activité oncolytique du virus, induit la régression des tumeurs infectées et a également un effet thérapeutique global à distance, appelé effet abscopal, qui permet la régression des tumeurs non infectées.

Une des limites notables de la virothérapie oncolytique réside dans la neutralisation et l'élimination rapide du virus par le système immunitaire de l'hôte. Mais la sollicitation de ce dernier a été démontrée comme étant primordiale pour l'efficacité du traitement ! Plusieurs études précliniques ont montré, chez la souris, que l'activation des réponses immunitaires par le virus se révélait être spécifiquement dirigée contre la tumeur et essentielle pour obtenir une efficacité thérapeutique [5]. L'enjeu principal reste alors l'accessibilité du virus dans la tumeur et explique pourquoi, jusqu'à aujourd'hui, les résultats cliniques majeurs ont été obtenus par injection intra-tumorale des OV. Les tumeurs touchant des organes difficilement accessibles par injection intra-tumorale, comme le cerveau, les poumons ou le pancréas, peuvent être ciblées par voie intraveineuse, ce qui permet également le ciblage des métastases et micro-métastases. Néanmoins, lorsqu'il est injecté par voie intraveineuse, le virus est directement sujet à une neutralisation par les premières lignes de défenses antivirales du système immunitaire, que sont l'activation du complément ou la présence d'anticorps neutralisants. Certains virus enveloppés, comme



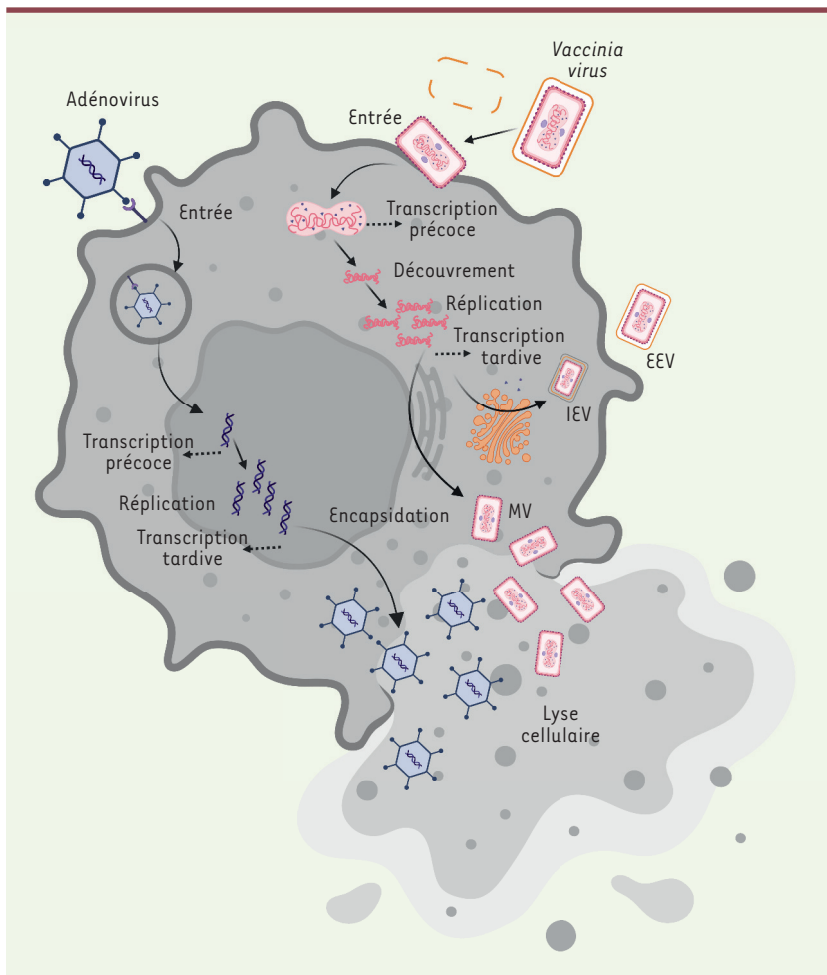
**Figure 2. Principe de la virothérapie oncolytique.** Les virus oncolytiques (OV) induisent la mort des cellules cancéreuses de manière directe, suite à la réplication virale, et de manière indirecte par l'induction d'une mort cellulaire immunogène. Pour amplifier l'action anti-tumorale des OV, ces derniers peuvent être armés avec des gènes codant des protéines cytotoxiques, des gènes codant des protéines immunomodulatrices, ou encore, des gènes permettant d'améliorer la diffusion du virus dans la masse tumorale. DAMP : *damage-associated molecular patterns* ; PAMP : *pathogen-associated molecular patterns* ; TAA : *antigènes associés aux tumeurs (tumor-associated antigens)*.

les virus de la vaccine (VACV), possèdent des mécanismes autonomes qui leur confèrent une sensibilité réduite à la neutralisation due à l'activation du complément : l'expression de la protéine de contrôle du complément (VCP, pour *vaccinia virus control protein*) des VACV et la formation de virions extracellulaires enveloppés (EEV, pour *extra-cellular enveloped virion*). La VCP inhibe la formation de la convertase C3, qui joue un rôle central dans l'activation du complément. En ce qui concerne les particules d'EEV, ces dernières acquièrent des protéines régulatrices du complément de la cellule hôte, qui les protègent de la destruction due au complément. Ces deux processus adaptatifs restent néanmoins peu efficaces lorsque le virus est injecté par voie générale, car ils nécessitent un premier cycle de réplication virale dans la cellule hôte.

### Les OV comme vecteurs de protéines thérapeutiques

L'ingénierie génétique des OV a permis d'obtenir de nouvelles souches plus spécifiques des cellules cancéreuses et donc plus sûres pour les patients. Elle a aussi contribué à l'amélioration de leur efficacité

anti-tumorale, via l'introduction de transgènes thérapeutiques dans leur génome. L'utilisation des OV comme vecteurs de molécules d'intérêt a permis de cibler la distribution de la molécule dans la tumeur et, ainsi, de limiter ses risques de toxicité, de surmonter les contraintes de perméabilité membranaire et de faible diffusion et, enfin, de pallier le manque d'efficacité lié aux demi-vies courtes, la molécule étant produite *de novo* à chaque cycle viral. Une fois internalisé dans le cytoplasme ou le noyau (selon la famille du virus utilisé), l'OV bénéficie de la machinerie cellulaire et peut débiter sa réplication. Le cycle se déroule généralement en plusieurs étapes (Figure 3). Dans un premier temps, l'expression des protéines précoces débute avant même que la duplication de l'ADN viral ait été initiée. Ensuite, les protéines tardives, comme les protéines constituant la capsid virale, sont exprimées à la fin de la phase de réplication. Afin de modifier un OV pour qu'il produise localement des molécules thérapeutiques, le choix du promoteur est à



**Figure 3. Cycle viral des virus oncolytiques (OV).**

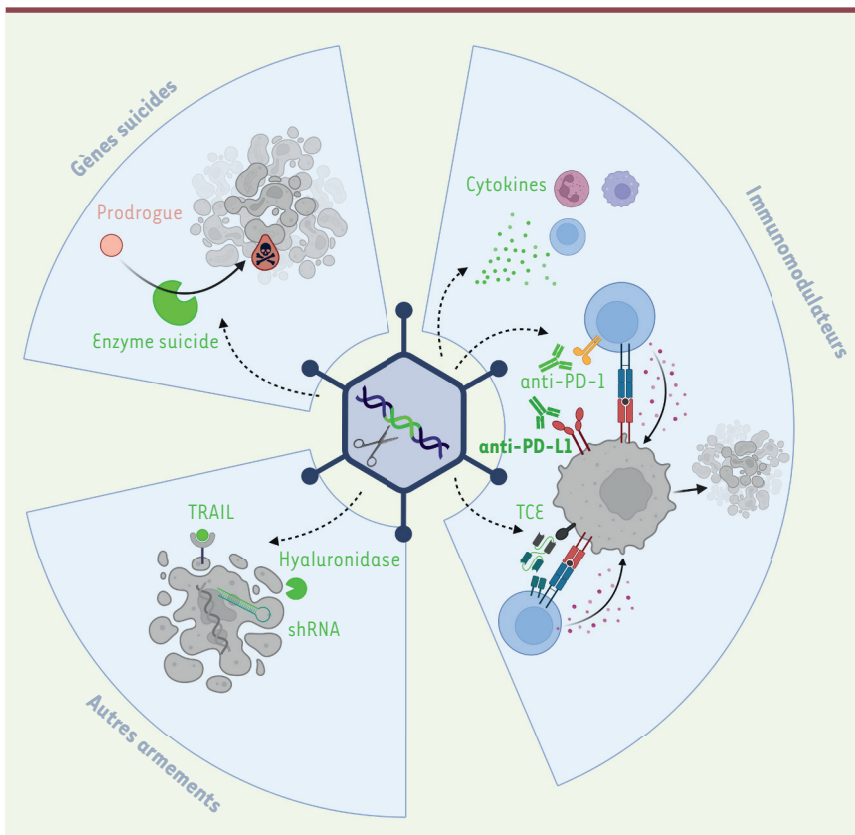
Une fois entré dans la cellule hôte, l'OV initie sa transcription précoce avec les ARN polymérases présentes dans le cytosol de cette dernière. Les protéines exprimées durant cette première vague de transcription permettent de synthétiser les nucléotides pour la réplication et de bloquer les réponses innées de l'hôte. La réplication de l'ADN viral débute dans un deuxième temps. Les gènes exprimés en fin de cycle, la transcription tardive, codent les protéines structurales qui constituent la capsid virale et les enzymes qui seront contenues dans le virion mature (MV). La répétition des cycles conduit à l'accumulation de MV et à l'éclatement de la cellule hôte. Les virus de la vaccine diffusent sous forme MV ou s'entourent d'une double membrane lipidique issue du réseau transgolgien (virion enveloppé intracellulaire [IEV, pour *intracellular enveloped virion*]) et diffusent sous forme de virion enveloppé extracellulaire (EEV, pour *extracellular enveloped virion*).

prendre en compte. En effet, en utilisant un promoteur de gène précoce, le transgène sera exprimé avant même que le virus ne se soit répliqué dans les cellules cancéreuses. En revanche, en choisissant un promoteur de gène tardif, l'expression du transgène ne sera effective que si le virus parvient à se répliquer, ce qui restreint l'expression aux cellules cancéreuses. Deux exemples illustrent l'importance du choix d'un promoteur de gènes précoce ou tardif : l'expression d'un transgène codant le récepteur CXCR3 (*C-X-C motif chemokine receptor 3*) par les cellules non tumorales initialement infectées, sous le contrôle d'un promoteur de gène précoce, conduit à la migration de ces cellules infectées CXCR3<sup>+</sup> vers les cellules tumorales qui produisent les chimiokines spécifiques de ce récepteur (CXCL [*C-X-C motif chemokine ligand*] 9, 10, 11), et permet ainsi d'acheminer l'OV, protégé du système immunitaire, jusqu'à la tumeur [6]. *A contrario*, les transgènes codant des molécules ayant une fonction cytotoxique seront préférentiellement contrôlés par un promoteur tardif pour garantir leur expression exclusivement dans les cellules tumorales [7].

### L'armement avec des gènes suicides

Un gène suicide est un gène qui code une enzyme dont la fonction est de catalyser un substrat non toxique (prodrogue) en un produit cytotoxique (Figure 4). L'armement des OV avec ce type de trans-

gène a permis d'augmenter leur action thérapeutique. L'activation de l'effet cytotoxique du transgène se fait par l'administration de la prodrogue, ce qui permet de contrôler son action dans le temps, et de la découpler de la propagation du virus dans la masse tumorale. Le premier système de gène suicide développé utilisait la thymidine kinase du HSV de type 1 (HSV-1-tk), une enzyme qui convertit le ganciclovir en un analogue nucléosidique fortement toxique pour les cellules en division [8]. Afin de disposer de ce système au niveau des tumeurs et de sensibiliser ainsi les cellules cancéreuses au ganciclovir, un adénovirus répliquatif (Ad.TKRC), exprimant le gène HSV-1-tk, a été construit et évalué dans différents modèles précliniques. De puissants effets anti-tumoraux ont été obtenus, confirmant ainsi la complémentarité de ces deux approches [9]. Le gène codant la cytosine déaminase (CD), une enzyme qui convertit la flucytosine (5-FU) en 5-fluorouracile (5-FU), est un autre gène suicide utilisé pour le traitement des tumeurs solides [10]. Grâce à cette technique d'activation de prodrogue, les patients traités avec un OV exprimant la CD, peuvent convertir le 5-FU en 5-FU,



**Figure 4. Stratégies d'armement des OV.**

Pour accentuer les effets thérapeutiques des OV, ces derniers peuvent être modifiés génétiquement pour exprimer *in situ* des molécules cytotoxiques (TRAIL, petits ARN en épingle à cheveux [shRNA], enzymes capables de détruire la matrice extracellulaire [hyaluronidase] ou encore enzymes capables de convertir une prodrogue en un produit toxique [enzyme suicide]). Enfin, les OV peuvent être modifiés pour exprimer des molécules immunomodulatrices, comme des cytokines qui vont permettre de recruter des cellules immunitaires et d'activer les cellules effectrices, des inhibiteurs de point de contrôle immunitaire (ICI) qui permettent de lever l'immunosuppression induite par la tumeur (anticorps anti-PD-1/anti-PD-L1) ou encore des molécules spécifiquement activatrices des lymphocytes T (TCE).

uniquement au niveau de la tumeur, limitant ainsi les effets secondaires liés à une administration par voie générale du 5-FU [11]. Ce système a été largement employé en virothérapie oncolytique et a été optimisé pour améliorer la conversion du 5-FC en 5-FU, en fusionnant la CD avec une uracile phosphoribosyltransférase (UPRT) [12, 13].

## L'armement avec des immunomodulateurs

### Les cytokines

L'un des enjeux majeurs de l'immunothérapie des cancers est de pallier la faible sensibilité des tumeurs « froides » aux traitements. Comme nous l'avons indiqué un peu plus haut, l'action oncolytique des OV conduit indirectement au « réchauffement » du TME. Pour accentuer cet effet, il est possible d'armer les OV avec des immunomodulateurs, comme les chimiokines et les interleukines (Figure 4). En se fixant à leurs récepteurs spécifiques et par le déclenchement de cascades de signalisation, les chimiokines induisent la migration de cellules immunitaires, le long d'un gradient de concentration. D'autres cytokines conduisent à la régulation de la prolifération de ces cellules immunitaires, à leur différenciation et à leur activation. L'administration thérapeutique de plusieurs cytokines a déjà été approuvée par la FDA, comme la combinaison de l'interleukine (IL)-2 et l'IFN- $\gamma$  pour le traitement de différents cancers [14]. L'avantage de les combiner aux OV permet de palier les effets toxiques dus à une administration par voie générale. L'IL-2 favorise l'expansion des cellules NK (*natural killer*) et des lymphocytes T. L'armement des OV avec le transgène codant

l'IL-2, utilisé en combinaison avec l'injection d'autres cytokines, a montré des effets thérapeutiques accrus des OV chez la souris. Ces effets incluent, notamment, l'augmentation des réponses anti-tumorales contre les tumeurs métastatiques non infectées [15], l'amélioration des transferts adoptifs dans le cadre de thérapies cellulaires [16] ou encore, l'induction de structures lymphoïdes tertiaires (TLS) dans le TME [17]. Cette dernière propriété est recherchée dans le cadre du développement de nouvelles immunothérapies, en particulier depuis qu'il a été démontré que les TLS étaient associées à un meilleur pronostic dans la majorité des cancers où des tumeurs solides sont présentes [18]. L'induction de TLS dans des tumeurs solides a aussi récemment été observée avec un adénovirus armé avec l'IL-15 [19]. Par ailleurs, l'expression exogène d'autres interleukines comme l'IL-7 [20], l'IL-12 [21] et l'IL-21 [22] par des OV armés, a permis d'augmenter considérablement l'infiltration immunitaire dans les tumeurs et, ainsi, d'amplifier la réponse anti-tumorale. L'armement des OV par les transgènes codant ces interleukines est couramment associé avec le facteur de nécrose tumorale TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor-alpha*) [16, 17], une cytokine pro-inflammatoire associée aux réponses anti-tumorales. Enfin, l'armement de l'HSV T-VEC par un transgène codant la cytokine à activité pléiotropique

GM-CSF, qui agit en particulier sur l'expansion et la maturation des cellules myéloïdes et favorise la présentation d'antigènes tumoraux par les cellules dendritiques (DC), a démontré son efficacité anti-tumorale, et son utilisation a été approuvée en 2015 par la FDA.

De la même manière que pour les interleukines, l'armement des OV avec des transgènes codant des chimiokines est un moyen de moduler le TME. L'utilisation de constructions contenant des transgènes codant CCL (*C-C motif chemokine ligand*) 19 [23] ou CCL21 [24], les deux ligands du récepteur CCR7 (*C-C motif chemokine receptor 7*), fortement exprimé par les lymphocytes T et les DC, a conduit à une augmentation de l'infiltration immunitaire et à l'amélioration de la réponse anti-tumorale. Les OV armés sont également un bon outil pour amplifier l'effet d'autres thérapies. L'utilisation d'un OV armé avec le transgène codant la chimiokine CCL5 a permis d'augmenter l'infiltration de cellules immunitaires et ainsi l'efficacité anti-tumorale d'une thérapie cellulaire fondée sur le transfert adoptif de cellules NK modifiées pour surexprimer CCR5, le récepteur de CCL5 [25].

L'efficacité d'un armement avec un transgène codant une chimiokine dépend de la mise en place d'un gradient physiologique de la molécule, une condition qui reste difficilement contrôlable en virothérapie et qui pourrait expliquer l'échec thérapeutique de certaines constructions prometteuses [26]. Dans la majorité des exemples cités, la cytokine exprimée par l'OV est sécrétée, ce qui, dans certains cas, accentue la diffusion de la molécule et, donc, les effets secondaires. L'ancrage à la membrane des cellules infectées d'une IL-12 modifiée par l'ajout d'une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI), a montré un maintien de la protéine dans la tumeur et une amélioration de l'activité anti-tumorale, sans toxicité associée au traitement [21].

### Les inhibiteurs de point de contrôle immunitaire (ICI)

Les points de contrôle immunitaire tels que le récepteur CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) exprimé à la surface des lymphocytes T, ou les molécules de l'axe PD-1 (*programmed cell death protein 1*)/PD-L1 (*programmed death-ligand 1*), sont responsables de l'échappement de certaines tumeurs à la réponse immunitaire. L'utilisation d'inhibiteurs de point de contrôle immunitaire (ICI) a révolutionné le champ des immunothérapies, en partie avec l'approbation en 2011 de l'ipilimumab, un anticorps monoclonal anti-CTLA-4. Bien que le taux de réponse au traitement varie d'un type de cancer à l'autre, il se situe généralement autour de 20 % [27]. Lorsque les tumeurs sont initialement peu infiltrées (tumeurs froides), l'administration d'un ICI a très souvent peu d'effet. La combinaison des ICI avec les OV a permis d'augmenter considérablement les effets thérapeutiques obtenus lorsque les deux traitements sont pratiqués en monothérapie [28, 29]. En induisant l'influx de cellules immunitaires dans le TME, les OV sensibilisent les tumeurs aux ICI. Inversement, suite à l'infection par un OV, la réponse pro-inflammatoire est généralement associée avec une surexpression de PD-L1 dans le TME : la co-administration avec un ICI permet alors de lever l'immunosuppression exercée par PD-L1 et d'augmenter l'efficacité de l'OV [28]. L'armement des OV avec un transgène codant un anticorps anti-CTLA-4 et/ou un anticorps anti-PD-L1 a démontré des effets immunitaires améliorés, marqués par

la réduction du nombre de lymphocytes T régulateurs dans la tumeur, une meilleure maturation des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et l'activation des réponses spécifiques des lymphocytes T dirigées contre des néo-épitopes [29], conduisant à une meilleure réponse anti-tumorale directe et abscopale. Bien que, dans ces études précliniques, la réponse associée à un OV non armé co-administré avec l'ICI par voie générale reste généralement plus forte que celle obtenue avec l'OV armé avec l'ICI, le recours aux OV armés assure la localisation de la molécule thérapeutique principalement dans la tumeur et prévient ainsi des effets secondaires, souvent sévères, observés dans le traitement par les ICI.

### Les activateurs de molécules de costimulation

Les molécules de costimulation sont exprimées à la surface des cellules immunitaires et, une fois engagées, participent aux signaux d'activation et de différenciation des cellules. L'administration de ligands agonistes de ces molécules est une stratégie thérapeutique pour amplifier les réponses immunitaires. L'un des ligands activateurs du système immunitaire les plus étudiés est le ligand du cluster de différenciation 40 (CD40), le CD40-L. La liaison de CD40-L à son récepteur CD40, présent à la surface des cellules présentatrices d'antigène, augmente considérablement la capacité de présentation de l'antigène et de costimulation de ces dernières et permet une activation efficace des lymphocytes T cytotoxiques CD8<sup>+</sup> [30]. Des OV armés avec le CD40-L ont été beaucoup testés et ont démontré de multiples activités anti-tumorales, notamment le contrôle de la croissance tumorale, l'augmentation des ratios lymphocytes T effecteurs/régulateurs et la hausse des cytokines Th1 [31]. À titre d'exemple, un adénovirus oncolytique armé avec le CD40-L (CGTG-401) a été utilisé dans le traitement de tumeurs solides avancées, démontrant l'induction de réponses des lymphocytes T spécifiques de la tumeur chez la majorité des patients [32]. Cette étude a également montré une réponse à distance sur des tumeurs non injectées, ce qui suggère l'induction de réponses immunitaires générales contre la tumeur. Une autre illustration de l'utilisation d'OV armés avec des agonistes ligands est l'adénovirus oncolytique LOAd703. Cet adénovirus est armé avec le CD40-L et un autre ligand de la famille des récepteurs du TNF- $\alpha$ , 4-1BB-L. La signalisation par 4-1BB/4-1BB-L régule les dernières phases de l'activation des lymphocytes T cytotoxiques et pro-inflammatoires, en améliorant la prolifération, la survie, la fonction effectrice et l'induction de la mémoire de ces lymphocytes [33]. LOAd703 fait actuellement l'objet de deux essais cli-

niques de phase I/II. D'autres molécules de costimulation ont démontré des résultats précliniques encourageants après vectorisation des OV, tels que OX40-L [34] et GITR (*glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein*) [35].

### Les activateurs de lymphocytes T

Les activateurs de lymphocytes T (TCE) sont un autre type de molécules activatrices. Il s'agit d'anticorps bispécifiques (AcBs, dont l'un des formats, BiTE [pour *Bispécific T-cell Engager*], est devenu un format de référence) capables de se fixer à la fois à une cellule cancéreuse, par la reconnaissance de l'un de ses antigènes, et à un lymphocyte T par sa protéine membranaire CD3. Cette double interaction permet de rediriger les lymphocytes T naïfs du TME en lymphocytes T effecteurs contre la tumeur, indépendamment de l'expression des molécules d'histocompatibilité (HLA) et de la présentation antigénique (Figure 4). Cette approche a démontré une efficacité clinique considérable. Le blinatumomab, un BiTE CD19-CD3, a été approuvé pour le traitement des leucémies aiguës lymphoblastiques à précurseurs B. Cependant, l'administration par voie générale des BiTE est souvent associée à des toxicités parfois extrêmement sévères. De plus, l'efficacité contre les tumeurs solides est très limitée en raison des barrières physiques, d'une demi-vie sérique limitée, et d'un microenvironnement tumoral immunosuppresseur. La stratégie de vectorisation via un OV semble donc totalement adaptée à ce type de molécules. Le premier exemple de vectorisation dans un OV est un VACV armé d'un BiTE ciblant la molécule EphA2. Cet OV a démontré dans des essais de coculture non seulement une action oncolytique sur les cellules tumorales infectées, mais a induit également la destruction des cellules tumorales non infectées, en présence de lymphocytes T humains non stimulés [36]. Plus récemment, un adénovirus oncolytique intégrant dans son génome un MUC16-BiTE, un BiTE dont l'un des bras cible MUC16, une mucine surexprimée par les cellules tumorales dans les cancers ovariens, a démontré une efficacité anti-tumorale accrue dans des modèles de souris humanisées [37].

### Les autres types d'armements

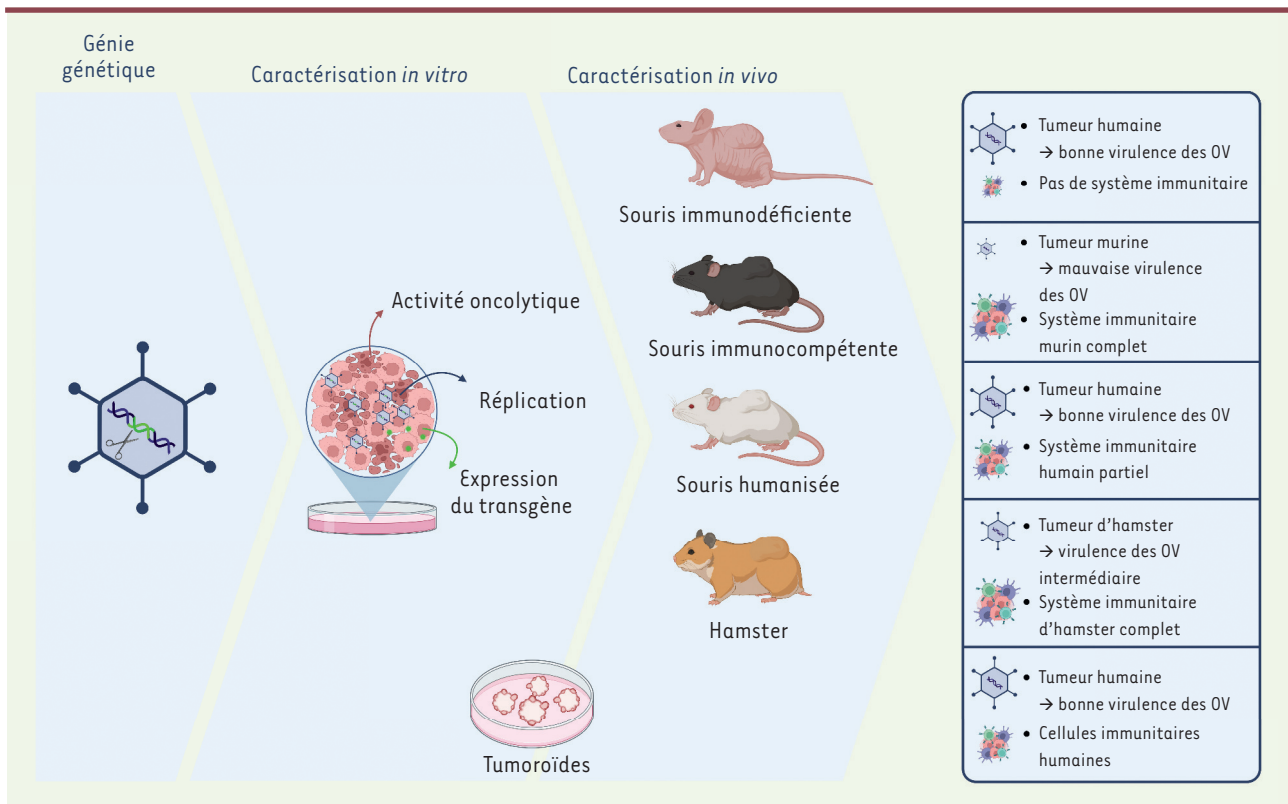
Des transgènes codant certaines protéines ayant des propriétés cytotoxiques peuvent être utilisés pour l'armement des OV, comme c'est le cas pour le transgène codant la molécule TRAIL (*tumor-necrosis-factor related apoptosis-inducing ligand*). Des chercheurs ont ainsi combiné l'armement d'un OV avec le transgène codant TRAIL et celui codant l'angiopoïétine-1 (Ang1) [38]. En se fixant à son récepteur tyrosine kinase Tie-2, Ang1 renforce les jonctions entre cellules endothéliales et contribue à la vascularisation du tissu. Alors que le blocage de l'angiogenèse est une stratégie souvent utilisée pour limiter la croissance tumorale, les chercheurs ont ici utilisé Ang1 pour cet effet favorisant la vascularisation afin d'améliorer la délivrance de TRAIL dans la tumeur et rétablir l'homéostasie du tissu suite à la double action cytotoxique de l'OV et de TRAIL. Pour amplifier l'effet adjuvant des OV, d'autres chercheurs ont choisi d'utiliser un transgène codant la sous-unité B d'un flagelle bactérien afin d'activer les récepteurs TLR-5 (*Toll-like receptor 5*) et ainsi l'immunité innée [39]. D'autres approches ont consisté à limiter la prolifération des cellules

cancéreuses pour provoquer leur apoptose, en intégrant dans le génome viral de petits ARN en épingle à cheveux (shRNA), qui interfèrent avec des gènes spécifiquement surexprimés dans les cellules cancéreuses, comme le gène codant le facteur de transcription OCT4 et celui de la survivine [40]. Enfin, pour améliorer la dissémination des OV dans la tumeur, certains OV ont été armés avec des transgènes codant des enzymes dont la fonction est de dissocier la matrice extracellulaire, comme la hyaluronidase [41].

## Les pistes d'amélioration

### Améliorer l'accès des OV dans la tumeur

Malgré l'essor de la recherche visant à développer de nouvelles stratégies d'armement pour améliorer l'activité thérapeutique des OV depuis les années 2010, les études axées sur l'accès et le maintien des OV dans la tumeur redeviennent une priorité pour le développement de cette thérapie. C'est pourquoi la création de nouvelles charpentes virales (ou « *backbones* » viraux) reste au cœur des recherches, afin de disposer de souches recombinantes capables de mieux échapper au système immunitaire de l'hôte et ainsi de mieux atteindre la tumeur, notamment dans le cas des administrations par voie intraveineuse, mais également capables de mieux diffuser dans l'ensemble de la masse tumorale. Une première stratégie consiste à introduire dans les OV des transgènes codant des molécules permettant d'échapper à l'action des molécules de défense anti-virales, par exemple des molécules agissant sur le gène codant la protéine régulatrice du complément (CRP) CD55 [6] ou sur les gènes *B5R* et *A34R* impliqués dans la formation des formes EEV dans le cas des VACV [7]. Nous avons vu précédemment que l'armement avec le transgène codant la hyaluronidase permet d'amplifier la propagation du virus. Des chercheurs ont proposé de combiner l'expression de la hyaluronidase avec l'expression d'un domaine de liaison à l'albumine (ABD) à la surface de la capsid virale, afin que l'OV puisse s'auto-protéger des anticorps neutralisants [42]. Pour échapper aux anticorps neutralisants, d'autres études ont proposé de charger les OV dans des structures permettant leur transport : il peut s'agir de vecteurs physiques, comme les capsules « CellDex », des capsules d'hydrogel microporeuses qui permettent de protéger l'OV tout en assurant sa diffusion [43], ou encore, des vecteurs cellulaires, comme les cellules souches mésenchymateuses qui ciblent naturellement les tumeurs lorsqu'elles sont injectées dans la circulation générale [44]. Enfin, lorsque le génome viral est suffisamment petit, son ADN codant (ADNc) peut directement être



**Figure 5. Modèles précliniques pour le développement d'OV recombinants.** Pour évaluer l'armement d'un nouvel OV recombinant, une première étape de caractérisation *in vitro* consiste à vérifier si le virus recombinant préserve bien ses propriétés oncolytiques et s'il est capable d'exprimer le transgène. Pour caractériser ses effets *in vivo*, plusieurs modèles existent. Les modèles de tumeurs humaines permettent de respecter le tropisme humain des OV et assurent une meilleure efficacité oncolytique. Les modèles où une immunocompétence est présente permettent d'estimer les effets de l'OV sur l'immunité.

cloné dans des cellules. Cette stratégie a été validée *in vitro* avec l'intégration de l'ADNc d'un Coxsackievirus A21 (CVA21) dans des cellules HEK293T, qui, après clonage, conservent leur viabilité et produisent *de novo* le CVA21 recombinant [45].

### Développer les modèles permettant la caractérisation rapide des OV

La caractérisation *in vitro* de souches recombinantes d'OV ne représente actuellement pas une limite au développement de la technique. L'activité oncolytique de l'OV recombinant est rapidement évaluée sur les cellules d'une multitude de lignées cancéreuses. La production des molécules codées par les transgènes est efficacement détectée ; les molécules sont dosées, et leur activité peut être confirmée par différents tests fonctionnels *in vitro*. En revanche, la caractérisation *in vivo* pose plus de contraintes. En effet, les OV sont sélectionnés pour leur tropisme particulier à se répliquer dans les cellules cancéreuses humaines. Ainsi, leur potentiel thérapeutique ne peut être fidèlement reproduit dans les modèles précliniques actuels. Les modèles de xéno-greffes à des souris immunodéficientes permettent d'évaluer l'action oncolytique directe des OV sur les cellules de différentes lignées cancéreuses humaines ou sur des cellules primaires dérivant de patients grâce aux modèles de xéno-greffes dérivées de patients (PDX pour

*patient-derived xenografts*). En revanche, en l'absence d'un système immunitaire complet, ces modèles ne permettent pas d'évaluer l'intégralité des effets, comme la résistance de l'OV face à la réponse antivirale de l'hôte, ou encore, sa capacité à moduler le microenvironnement immunitaire, en particulier lorsqu'il a été modifié pour exprimer des immunomodulateurs. Bien que, dans les modèles syngéniques, le fonctionnement du système immunitaire soit normal, il reste différent de celui de l'espèce humaine et les cellules des tumeurs d'espèces animales autres que celle-ci sont sensiblement plus réfractaires aux OV [46]. Néanmoins, le hamster syrien apparaît comme un modèle « idéal » pour l'évaluation d'immunothérapies des cancers [47] et pour la caractérisation de certains OV, notamment les adénovirus oncolytiques [48]. Les modèles de souris humanisées sont une bonne alternative pour respecter le tropisme des OV, en utilisant des tumeurs humaines, tout en observant les effets sur la réponse immunitaire conduite par les cellules immunitaires humaines préalablement greffées. Enfin, les modèles de tumoroides, en reproduisant plus fidèlement l'architecture tumorale



que ce que proposent les modèles bidimensionnels usuels, tout en pouvant intégrer des systèmes de microfluidique, offrent dorénavant une nouvelle alternative (Figure 5).

## Conclusion

La virothérapie oncolytique a su démontrer son efficacité dans le traitement de certains cancers et offre aujourd'hui d'intéressantes perspectives pour l'immunothérapie. Actuellement, la majorité des OV en clinique ou en développement ne sont pas armés, ou ne portent qu'un seul transgène, ce qui peut être insuffisant pour une activation optimale des réponses immunitaires anti-tumorales. L'utilisation de l'intégralité de la capacité de clonage des OV, afin d'intégrer plusieurs transgènes dans un même génome, pourrait assurer des effets anti-tumoraux globaux robustes. En effet, la plasticité du génome des OV permet d'effectuer des clonages de fragments d'ADN de très grandes tailles, pouvant représenter généralement jusqu'à 10 % du génome viral. À cette fin, ONCR-177, un HSV-1 oncolytique, a été armé avec cinq transgènes différents, codant l'IL-12, le FLT3 Ligand, CCL-4, un anticorps anti-PD-1 et un anticorps anti-CTLA-4, permettant de disposer d'une large panoplie de modes d'action contre les tumeurs en un seul traitement [49].

Enfin, d'autres techniques plus empiriques comme l'évolution dirigée, qui consiste à mélanger plusieurs souches et à inciter leur recombinaison pour accélérer les processus de sélection naturelle, sont toujours employées pour générer efficacement de nouveaux variants viraux [50]. ♦

## SUMMARY

### Oncolytic viruses : Actors and deliverers of therapeutic proteins against tumors

The discovery of the unique ability of certain viruses to specifically target cancer cells has led to significant advancements in cancer immunotherapy research. In addition to inducing specific lysis of cancer cells, oncolytic viruses (OV) have been genetically modified to express molecules of interest within the tumor bed. The use of OV as vectors for therapeutic molecules has allowed to enhance antitumor responses while limiting the adverse effects associated with systemic administration of the molecule. Other studies are currently focused on delaying the neutralization and clearance of the virus by the host's immune system and improving its delivery insight tumors. ♦

## LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

## RÉFÉRENCES

- Dock G. The influence of complicating diseases upon leukaemia. *The American Journal of the Medical Sciences* (1827-1924) 1904 ; 127 : 563. <https://www.proquest.com/openview/eb5cb1ae1913ff84c02cc61afbbd8d5e/1?cbi=41361&pq-origsite=gscholar>
- Bierman HR, Crile DM, Dod KS, et al. Remissions in leukemia of childhood following acute infectious disease. Staphylococcus and streptococcus, varicella, and feline panleukopenias. *Cancer* 1953 ; 6 : 591-605.
- Liang M. Oncorine, the World First Oncolytic Virus Medicine and its Update in China. *Curr Cancer Drug Targets* 2018 ; 18 : 171-6.
- Pol J, Kroemer G, Galluzzi L. First oncolytic virus approved for melanoma immunotherapy. *Oncimmunology* 2015 ; 5 : e1115641.
- Ricca JM, Oseledchik A, Walther T, et al. Pre-existing Immunity to Oncolytic Virus Potentiates Its Immunotherapeutic Efficacy. *Mol Ther* 2018 ; 26 : 1008-19.
- Muthuswamy R, Thorne S, Carter C, et al. 894 A novel oncolytic immunotherapy, VET3-TGI, overcomes TGFβ1 mediated immunosuppression, augments type-1 immune response, and displays potent therapeutic activity in multiple mouse tumor models. *J Immunother Cancer* 2022 ; 10.
- Fu X, Meng F, Tao L, et al. A strict-late viral promoter is a strong tumor-specific promoter in the context of an oncolytic herpes simplex virus. *Gene Ther* 2003 ; 10 : 1458-64.
- Moolten FL, Wells J.-M. Curability of tumors bearing herpes thymidine kinase genes transferred by retroviral vectors. *J Natl Cancer Inst* 1990 ; 82 : 297-300.
- Wildner O, Morris JC, Vahanian NN, et al. Adenoviral vectors capable of replication improve the efficacy of HSVtk/GCV suicide gene therapy of cancer. *Gene Ther* 1999 ; 6 : 57-62.
- Mullen CA, Kilstrup M, Blaese RM. Transfer of the bacterial gene for cytosine deaminase to mammalian cells confers lethal sensitivity to 5-fluorocytosine : a negative selection system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 33-37.
- McCart JA, Puhlmann M, Lee J, et al. Complex interactions between the replicating oncolytic effect and the enzyme/prodrug effect of vaccinia-mediated tumor regression. *Gene Ther* 2000 ; 7 : 1217-23.
- Foloppe J, Kintz J, Futin N, et al. Targeted delivery of a suicide gene to human colorectal tumors by a conditionally replicating vaccinia virus. *Gene Ther* 2008 ; 15 : 1361-71.
- Erbs P, Regulier E, Kintz J, 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 : 3813-22.
- Berraondo P, Sanmamed MF, Ochoa MC, et al. Cytokines in clinical cancer immunotherapy. *Br J Cancer* 2019 ; 120 : 6-15.
- Liu W, Dai E, Liu Z, et al. In Situ Therapeutic Cancer Vaccination with an Oncolytic Virus Expressing Membrane-Tethered IL-2. *Mol Ther - Oncolytics* 2020 ; 17 : 350-60.
- Santos JM, Cervera-Carrascón V, Havunen R, et al. Adenovirus Coding for Interleukin-2 and Tumor Necrosis Factor Alpha Replaces Lymphodepleting Chemotherapy in Adoptive T Cell Therapy. *Mol Ther* 2018 ; 26 : 2243-54.
- Clubb JHA, Kudling TV, Heiniö C, et al. Adenovirus Encoding Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin 2 Induces a Tertiary Lymphoid Structure Signature in Immune Checkpoint Inhibitor Refractory Head and Neck Cancer. *Front Immunol* 2022 ; 13 : 794251.
- Dieu-Nosjean M-C, Goc J, Giraldo NA, et al. Tertiary lymphoid structures in cancer and beyond. *Trends Immunol* 2014 ; 35 : 571-80.
- He T, Hao Z, Lin M, et al. Oncolytic adenovirus promotes vascular normalization and nonclassical tertiary lymphoid structure formation through STING-mediated DC activation. *Oncimmunology* 2022 ; 11 : 2093054.
- Kudling TV, Clubb JHA, Quixabeira DCA, et al. Local delivery of interleukin 7 with an oncolytic adenovirus activates tumor-infiltrating lymphocytes and causes tumor regression. *Oncimmunology* 2022 ; 11 : 2096572.
- Ge Y, Wang H, Ren J, et al. Oncolytic vaccinia virus delivering tethered IL-12 enhances antitumor effects with improved safety. *J Immunother Cancer* 2020 ; 8 : e000710.
- Chen T, Ding X, Liao Q, et al. IL-21 arming potentiates the anti-tumor activity of an oncolytic vaccinia virus in monotherapy and combination therapy. *J Immunother Cancer* 2021 ; 9 : e001647.
- Li J, O'Malley M, Sampath P, et al. Expression of CCL19 from oncolytic vaccinia enhances immunotherapeutic potential while maintaining oncolytic activity. *Neoplasia N Y N* 2012 ; 14 : 1115-21.
- Flanagan K, Glover RT, Högri H, et al. Local delivery of recombinant vaccinia virus expressing secondary lymphoid chemokine (SLC) results in a CD4 T-cell dependent antitumor response. *Vaccine* 2004 ; 22 : 2894-903.
- Li F, Sheng Y, Hou W, et al. CCL5-armed oncolytic virus augments CCR5-engineered NK cell infiltration and antitumor efficiency. *J Immunother Cancer* 2020 ; 8 : e000131.
- Eckert EC, Nace RA, Tonne JM, et al. Generation of a Tumor-Specific Chemokine Gradient Using Oncolytic Vesicular Stomatitis Virus Encoding CXCL9. *Mol Ther Oncolytics* 2020 ; 16 : 63-74.
- Champiat S, Lambotte O, Barreau E, et al. Management of immune checkpoint blockade dysimmune toxicities : a collaborative position paper. *Ann Oncol* 2016 ; 27 : 559-74.

## RÉFÉRENCES

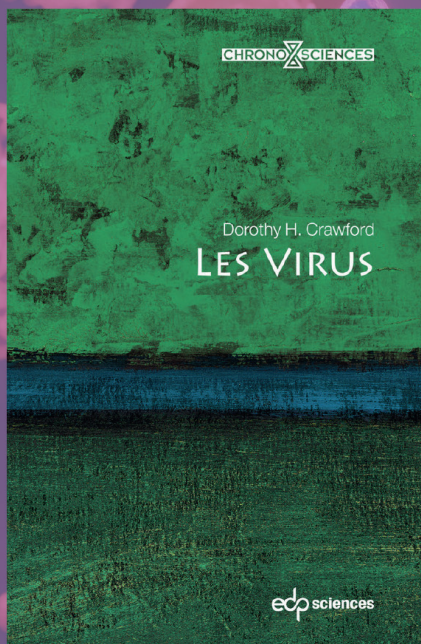
28. Kleinpeter P, Fend L, Thioudellet C, et al. Vectorization in an oncolytic vaccinia virus of an antibody, a Fab and a scFv against programmed cell death -1 (PD-1) allows their intratumoral delivery and an improved tumor-growth inhibition. *Oncimmunology* 2016 ; 5 : e1220467.
29. Wang G, Kang X, Chen KS, et al. An engineered oncolytic virus expressing PD-L1 inhibitors activates tumor neoantigen-specific T cell responses. *Nat Commun* 2020 ; 11 : 1395.
30. Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, et al. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 1998 ; 393 : 478-80.
31. Schiza A, Wenthe J, Mangsbo S, et al. Adenovirus-mediated CD40L gene transfer increases T effector/Tregulatory cell ratio and upregulates death receptors in metastatic melanoma patients. *J Transl Med* 2017 ; 15 : 79.
32. Pesonen S, Diaconu I, Kangasniemi L, et al. Oncolytic immunotherapy of advanced solid tumors with a CD40L-expressing replicating adenovirus : assessment of safety and immunologic responses in patients. *Cancer Res* 2012 ; 72 : 1621-31.
33. Melero I, Shuford WW, Newby SA, et al. Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nat Med* 1997 ; 3 : 682-5.
34. Tian L, Liu T, Jiang S, et al. Oncolytic Newcastle disease virus expressing the co-stimulator OX40L as immunopotentiator for colorectal cancer therapy. *Gene Ther* 2023 ; 30 : 64-74.
35. Calmels B, Paul S, Futin N, et al. Bypassing tumor-associated immune suppression with recombinant adenovirus constructs expressing membrane bound or secreted GITR-L. *Cancer Gene Ther* 2005 ; 12 : 198-205.
36. Yu F, Wang X, Guo ZS, et al. T-cell engager-armed oncolytic vaccinia virus significantly enhances antitumor therapy. *Mol Ther* 2014 ; 22 : 102-11.
37. Wang Q, Ma X, Wu H, et al. Oncolytic adenovirus with MUC16-BiTE shows enhanced antitumor immune response by reversing the tumor microenvironment in PDX model of ovarian cancer. *Oncimmunology* 2022 ; 11 : 2096362.
38. Jeong S-N, Yoo SY. Novel Oncolytic Virus Armed with Cancer Suicide Gene and Normal Vasculogenic Gene for Improved Anti-Tumor Activity. *Cancers* 2020 ; 12 : 1070.
39. Shakiba Y, Vorobyev PO, Naumenko VA, et al. Oncolytic Efficacy of a Recombinant Vaccinia Virus Strain Expressing Bacterial Flagellin in Solid Tumor Models. *Viruses* 2023 ; 15 : 828.
40. Li C, Zhu M, Lu Q, et al. Oncolytic adenovirus-mediated dual knockdown of survivin and OCT4 improves therapeutic efficacy in esophageal cancer. *Ann Transl Med* 2023 ; 11 : 193.
41. Guedan S, Rojas JJ, Gros A, et al. Hyaluronidase Expression by an Oncolytic Adenovirus Enhances Its Intratumoral Spread and Suppresses Tumor Growth. *Mol Ther* 2010 ; 18 : 1275-83.
42. Mato-Berciano A, Morgado S, Maliandi MV, et al. Oncolytic adenovirus with hyaluronidase activity that evades neutralizing antibodies : VCN-11. *J Control Release* 2021 ; 332 : 517-28.
43. Schaik TA van, Moreno-Lama L, Aligholipour Farzani T, et al. Engineered cell-based therapies in ex vivo ready-made CellDex capsules have therapeutic efficacy in solid tumors. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother* 2023 ; 162 : 114665.
44. Ho CT, Wu MH, Chen MJ, et al. Combination of Mesenchymal Stem Cell-Delivered Oncolytic Virus with Prodrug Activation Increases Efficacy and Safety of Colorectal Cancer Therapy. *Biomedicines* 2021 ; 9 : 548.
45. Sam M, Selman M, Zhao W, et al. Engineering Oncolytic Coxsackievirus A21 with Small Transgenes and Enabling Cell-Mediated Virus Delivery by Integrating Viral cDNA into the Genome. *J Virol* 2023 ; e0030923.
46. Jogler C, Hoffmann D, Theegarten D, et al. Replication Properties of Human Adenovirus In Vivo and in Cultures of Primary Cells from Different Animal Species. *J Virol* 2006 ; 80 : 3549-58.
47. Jia Y, Wang Y, Dunmall LSC, et al. Syrian hamster as an ideal animal model for evaluation of cancer immunotherapy. *Front Immunol* 2023 ; 14.
48. Wold WSM, Toth K. Chapter three--Syrian hamster as an animal model to study oncolytic adenoviruses and to evaluate the efficacy of antiviral compounds. *Adv Cancer Res* 2012 ; 115 : 69-92.
49. Haines BB, Denslow A, Grzesik P, et al. ONCR-177, an Oncolytic HSV-1 Designed to Potentially Activate Systemic Antitumor Immunity. *Cancer Immunol Res* 2021 ; 9 : 291-308.
50. Ricordel M, Foloppe J, Antoine D, et al. Vaccinia Virus Shuffling : deVV5, a Novel Chimeric Poxvirus with Improved Oncolytic Potency. *Cancers* 2018 ; 10 : 231.

### TIRÉS À PART

A. Houel

# Tout savoir sur les Virus !

DE  
DOROTHY H. CRAWFORD



Les virus sont partout et, comme nous l'a rappelé la pandémie de COVID-19, ils ne peuvent être ignorés. De leur découverte à la compréhension de leurs structures complexes, cet ouvrage fournit un compte rendu complet et concis de la nature des virus, de la manière dont ils attaquent leurs hôtes et des efforts déployés pour les contrôler.

Dorothy H. Crawford fait le point sur l'augmentation récente des infections virales émergentes, en particulier les coronavirus, notamment les virus à l'origine du SRAS et du MERS, sans oublier le CoV-2 du SRAS responsable du COVID-19. L'auteure explique pourquoi le CoV-2 du SRAS a pu se propager rapidement pour devenir une pandémie alors que d'autres ont donné lieu à des épidémies plus localisées. Tourné vers l'avenir, ce livre propose des mesures de prévention et de gestion des futurs virus dangereux qui devraient émerger.

Disponible aussi en format e-book  
En vente sur [laboutique.edpsciences.fr](http://laboutique.edpsciences.fr)

ISBN : 978-2-7598-3054-1  
176 pages illustrées  
Prix : 12€

