

Avis de Soutenance

Madame Morgane DI PALMA SUBRAN

Biologie-Santé - Spécialité Immunologie

Soutiendra à huis clos ses travaux de thèse intitulés

Génération de virus oncolytiques permettant un ciblage tumoral conditionnel et la sécrétion d'inhibiteurs de point de contrôle à base de nanobodies

dirigés par Monsieur Patrick CHAMES

Soutenance prévue le **mardi 25 juin 2024** à 14h00

Lieu : 163 Avenue de Luminy l'Amphi 12, Bat B, 13009 Marseille

Salle : l'Amphi 12, Bat B

Composition du jury proposé


M. Patrick CHAMES	Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille	Directeur de thèse
Mme Marie-Alix POUL	Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier	Rapporteuse
M. Cyrille MATHIEU	Centre international de Recherche en Infectiologie	Rapporteur
Mme Marie VALERIO-LEPINIEC	Université Paris-Saclay	Examinatrice
M. Philippe PLATTET	Université de Berne	Invité

Mots-clés : immunologie,nanobodies,virus oncolytiques,cancérologie,

Résumé :

L'immunothérapie fait maintenant partie des principaux traitements contre le cancer, mais ces approches sont inefficaces sur les tumeurs peu infiltrées par les cellules immunitaires. Différentes stratégies sont développées pour recruter le système immunitaire dans les tumeurs, incluant les virus oncolytiques, qui ont un tropisme naturel ou induit pour les cellules tumorales. Certains virus peuvent de plus être modifiés pour vectoriser des agents thérapeutiques, tel le virus de la rougeole (MeV ; Measles Virus) ou son homologue canin, le virus de la maladie de carré (CDV ; Canine Distemper Virus), utilisable sur un modèle canin. Ce modèle est pertinent grâce à la forte homologie entre MeV et CDV. De plus, les chiens présentant un système immunitaire fonctionnel développent spontanément des astrocytomes surexprimant des antigènes identiques à ceux retrouvés dans les glioblastomes humains : IL-13RA2 et PD-L1. Notre projet consiste à vectoriser le CDV vers les tumeurs d'une part, et de l'ingénierer d'autre part pour conduire à l'expression d'anticorps thérapeutiques au sein de la tumeur, grâce à l'utilisation de nanobodies (Nbs). Nos recherches se basent sur le développement préalablement réalisé d'une version de CDV rendu incapable de reconnaître ses cibles naturelles grâce à des mutations ciblées de sa protéine de surface par l'équipe de Philippe PLATTET à Berne (Suisse). Nous avons choisi d'utiliser IL-13RA2 pour le reciblage du CDV . Nous avons pour cela développé et caractérisé des Nbs anti-IL-13RA2 canin. Nous n'avons

cependant pas pu pour l'instant confirmer la présence d'IL-13RA2 canin au sein de tissu cancéreux prélevés chez des chiens atteints de cancer du cerveau décrite dans la littérature. Concernant l'armement des virus, nous avons isolé et caractérisé des Nbs dirigés contre PD-L1 canin. Après avoir sélectionné les meilleurs candidats, nous avons démontré leur potentiel à bloquer l'interaction inhibitrice PD-1/PD-L1. Nous avons continué nos recherches en élaborant différentes constructions à base de Nbs afin d'accroître leur potentiel et développer une immunothérapie pouvant être utilisable chez le chien. Pour cela nous avons développé des formats biparatopiques utilisant deux nanobodies capable de bloquer ou non cet axe. Ces constructions biparatopiques ont été produites avec ou sans partie constante de l'anticorps pour évaluer la plus-value de fonction apportée par cette région. Nous avons pu démontrer l'amélioration d'efficacité de nos molécules tant au niveau de leur affinité que de leur capacité de blocage de l'axe inhibiteur PD-1/PD-L1. Nous avons également obtenu des résultats préliminaires prometteurs suggérant la possibilité d'ajout d'une fonction effectrice sur nos constructions. En effet, nous avons été en mesure d'induire la lyse des cellules tumorales en recrutant des cellules effectrices via le Fc. Ainsi, au cours de nos travaux nous avons pu développer différents types d'immunothérapies visant PD-L1 nous permettant d'armer le virus oncolytiques, ouvrant la possibilité de traiter des cancers canins variés dans le futur.

LE DOYEN

Georges LEONETTI

Résumé

L'immunothérapie fait maintenant partie des principaux traitements contre le cancer, mais ces approches sont inefficaces sur les tumeurs peu infiltrées par les cellules immunitaires. Différentes stratégies sont développées pour recruter le système immunitaire dans les tumeurs, incluant les virus oncolytiques, qui ont un tropisme naturel ou induit pour les cellules tumorales. Certains virus peuvent de plus être modifiés pour vectoriser des agents thérapeutiques, tel le virus de la rougeole (MeV ; Measles Virus) ou son homologue canin, le virus de la maladie de carré (CDV ; Canine Distemper Virus), utilisable sur un modèle canin. Ce modèle est pertinent grâce à la forte homologie entre MeV et CDV. De plus, les chiens présentant un système immunitaire fonctionnel développent spontanément des astrocytomes surexprimant des antigènes identiques à ceux retrouvés dans les glioblastomes humains : IL-13RA2 et PD-L1. Notre projet consiste à vectoriser le CDV vers les tumeurs d'une part, et de l'ingénierer d'autre part pour conduire à l'expression d'anticorps thérapeutiques au sein de la tumeur, grâce à l'utilisation de nanobodies (Nbs). Nos recherches se basent sur le développement préalablement réalisé d'une version de CDV rendu incapable de reconnaître ses cibles naturelles grâce à des mutations ciblées de sa protéine de surface par l'équipe de Philippe PLATTET à Berne (Suisse).

Nous avons choisi d'utiliser IL-13RA2 pour le reciblage du CDV. Nous avons pour cela développé et caractérisé des Nbs anti-IL-13RA2 canin. Nous n'avons cependant pas pu pour l'instant confirmer la présence d'IL-13RA2 canin au sein de tissu cancéreux prélevés chez des chiens atteints de cancer du cerveau décrite dans la littérature.

Concernant l'armement des virus, nous avons isolé et caractérisé des Nbs dirigés contre PD-L1 canin. Après avoir sélectionné les meilleurs candidats, nous avons démontré leur potentiel à bloquer l'interaction inhibitrice PD-1/PD-L1. Nous avons continué nos recherches en élaborant différentes constructions à base de Nbs afin d'accroître leur potentiel et développer une immunothérapie pouvant être utilisable chez le chien. Pour cela nous avons développé des formats biparatopiques utilisant deux nanobodies capable de bloquer ou non cet axe. Ces constructions biparatopiques ont été produites avec ou sans partie constante de l'anticorps pour évaluer la plus-value de fonction apportée par cette région. Nous avons pu démontrer l'amélioration d'efficacité de nos molécules tant au niveau de leur affinité que de leur capacité de blocage de l'axe inhibiteur PD-1/PD-L1. Nous avons également obtenu des résultats préliminaires prometteurs suggérant la possibilité d'ajout d'une fonction effectrice sur nos constructions. En effet, nous avons été en mesure d'induire la lyse des cellules tumorales en recrutant des cellules effectrices via le Fc. Ainsi, au cours de nos travaux nous avons pu développer différents types d'immunothérapies visant PD-L1 nous permettant d'armer le virus oncolytiques, ouvrant la possibilité de traiter des cancers canins variés dans le futur.

Abstract

Immunotherapy is now one of the main cancer therapy, but these approaches are ineffective on tumours that are poorly infiltrated by immune cells. Several strategies have been developed to recruit the immune system to tumours, including oncolytic viruses, which are either natural or induced tropism for tumour cells. Some viruses can also be modified to deliver therapeutic agents, such as measles virus (MeV) or its canine counterpart, canine distemper virus (CDV), which can be used in the canine model. This canine model is relevant because of the strong homology between MeV and CDV. In addition, dogs have a functional immune system and they can spontaneously develop astrocytomas overexpressing antigens identical to those found in human glioblastomas: IL-13RA2 and PD-L1. Our project involves both vectorising the CDV to tumours and engineering it to lead to the expression of therapeutic antibodies within the tumour, using nanobodies (Nbs). Our research is based on the previous development of a model CDV that is unable to recognise its natural targets through targeted mutations in its surface protein. This model virus was engineered by Philippe PLATTET's team in Berne (Switzerland).

To retarget the CDV, we chose to use IL-13RA2 as a target. We developed and characterised canine anti-IL-13RA2 Nbs to retarget the virus with the best clones obtained. However, we were so far unable to confirm the presence of canine IL-13RA2 in cancer tissue taken from dogs with brain cancer.

To arm the viruses, we isolated and characterised Nbs directed against canine PD-L1. After selecting the best candidates, we demonstrated their potential to block the PD-1/PD-L1 inhibitory interaction. We have pursued our research by developing different Nbs-based constructs to increase their potential and design an immunotherapy that can be applied in dogs. We developed biparatopic formats using a blocking and a non-blocking. These biparatopic constructs were produced with or without an Fc portion to assess its added value in terms of function. We were able to demonstrate the improved efficacy of our molecules in terms of both their affinity and their ability to block the PD-1/PD-L1 inhibitor activity. We also obtained promising preliminary results suggesting the possibility of adding an effector function to our constructs. Indeed, we were able to induce tumour cell lysis by recruiting effector cells via Fc. Thus, in the course of our work, we were able to develop several types of immunotherapies targeting PD-L1, enabling us to arm the oncolytic virus, opening the possibility of targeting various canine cancers in the future.