Université de Lille
UFR3S-Pharmacie

Année Universitaire 2025/2026

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Soutenue publiquement le 16/09/2026
Par Mr. Ibrahim CHAIBI

_____

Ingénierie des cellules tumorales comme stratégie thérapeutique : développement d'un vaccin cellulaire "off-the-shelf" pour le glioblastome et perspectives translationnelles

_____

Membres du jury :

Président : Madame le Docteur Julie DEMARET, Maître de conférences – Praticien Hospitalier
Faculté de Pharmacie de Lille, Centre Hospitalier Universitaire de Lille

Directeur de Thèse : Madame le Docteur Kadiombo BANTUBUNGI-BLUM**,** Maître de conférences des Universités
Faculté de Pharmacie de Lille, Centre Hospitalier Universitaire de Lille

Assesseur(s) : Madame la Docteur Julie DUMONT**,** Professeur des Universités
Faculté de Pharmacie de Lille, Centre Hospitalier Universitaire de Lille

Monsieur le Docteur Dao PHAN, Directeur de Recherche Clinique
Faculté de Pharmacie de Lille, Bayer HealthCare SAS

Membre(s) extérieur(s) : Monsieur Jérémy MAGALON, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Faculté de Pharmacie, Aix-Marseille Université – Assistance Publique–Hôpitaux de Marseille (AP-HM)

Université de Lille

Président	Régis BORDET
Premier Vice-président	Bertrand DÉCAUDIN
Vice-présidente Formation	Corinne ROBACZEWSKI
Vice-président Recherche	Olivier COLOT
Vice-président Ressources Humaine	Jean-Philippe TRICOIT
Directrice Générale des Services	Anne-Valérie CHIRIS-FABRE

UFR3S

Doyen	Dominique LACROIX
Premier Vice-Doyen, Vice-Doyen RH, SI et Qualité	Hervé HUBERT
Vice-Doyenne Recherche	Karine FAURE
Vice-Doyen Finances et Patrimoine	Emmanuelle LIPKA
Vice-Doyen International	Vincent DERAMECOURT
Vice-Doyen Coordination pluriprofessionnelle et Formations sanitaires	Sébastien D'HARANCY
Vice-Doyenne Formation tout au long de la vie	Caroline LANIER
Vice-Doyen Territoire-Partenariats	Thomas MORGENROTH
Vice-Doyen Santé numérique et Communication	Vincent SOBANSKI
Vice-Doyenne Vie de Campus	Anne-Laure BARBOTIN
Vice-Doyen étudiant	Victor HELENA

Faculté de Pharmacie

Vice - Doyen	Pascal ODOU
Premier Assesseur et	
Assesseur à la Santé et à l'Accompagnement	Anne GARAT
Assesseur à la Vie de la Faculté et	
Assesseur aux Ressources et Personnels	Emmanuelle LIPKA
Responsable de l'Administration et du Pilotage	Cyrille PORTA
Représentant étudiant	Honoré GUISE
Chargé de mission 1er cycle	Philippe GERVOIS
Chargée de mission 2eme cycle	Héloïse HENRY
Chargé de mission Accompagnement et Formation à la Recherche	Nicolas WILLAND
Chargé de mission Relations Internationales	Christophe FURMAN
Chargée de Mission Qualité	Marie-Françoise ODOU
Chargé de mission dossier HCERES	Réjane LESTRELIN

Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers (PU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique	81
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie	82
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie	82
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie	82
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie	82
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire	82

Professeurs des Universités (PU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique - RMN	85
M.	BERLARBI	Karim	Physiologie	86
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie	87
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle	85

M.	CARNOY	Christophe	Immunologie	87
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques	87
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique - RMN	85
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie thérapeutique	86
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie bio inorganique	85
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire	87
M.	ELATI	Mohamed	Biomathématiques	27
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie	87
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique	85
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique	86
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique	85
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie	86
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique	86
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques	26
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire	87
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire	87
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique	85
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie physique	85
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences végétales et fongiques	87
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie	87
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie	86

Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie	87
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie	86
M.	SERGHERAERT	Éric	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique	86

Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers (MCU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique	85
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie	82
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique	81
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
Mme	GILLIOT	Sixtine	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie	82
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie	82

Maîtres de Conférences des Universités (MCU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire	87
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique - RMN	85
M	BEDART	Corentin	ICPAL	86
M.	BOCHU	Christophe	Biophysique - RMN	85
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie	86
M.	BOSC	Damien	Chimie thérapeutique	86
Mme	BOU KARROUM	Nour	Chimie bioinorganique	
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie	87
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire	87
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	CHARTON	Julie	Chimie organique	86
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques	85
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques	27
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique	86
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	FLIPO	Marion	Chimie organique	86
M.	FRULEUX	Alexandre	Sciences végétales et fongiques	

M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86

M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie	87
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique	86
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques	26
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie	86
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie	87
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie	87
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique	85
Mme	LEHMANN	Hélène	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	LIBERELLE	Maxime	Biophysique - RMN	
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques	26
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie	86
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	
M.	MENETREY	Quentin	Bactériologie - Virologie	87
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques	85
M.	PIVA	Frank	Biochimie	85

Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique	86
M.	POURCET	Benoît	Biochimie	87
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / Innovations pédagogiques	85
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique	86
Mme	ROGEL	Anne	Immunologie	
M.	ROSA	Mickaël	Hématologie	87
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie	86
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie	87
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie	87
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie	87
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Chimie organique	86
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques	87
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique	86
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques	85

Professeurs certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mme	KUBIK	Laurence	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeurs Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	BAILLY	Christian	ICPAL	86
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Chimie thérapeutique	86
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie pharmaceutique	86

Maîtres de Conférences Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M	AYED	Elya	Pharmacie officinale	
M.	COUSEIN	Etienne	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques	85
Mme	DANICOURT	Frédérique	Pharmacie officinale	
Mme	DUPIRE	Fanny	Pharmacie officinale	
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques	85
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	85
Mme	GEILER	Isabelle	Pharmacie officinale	
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	MITOUMBA	Fabrice	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	86
M.	PELLETIER	Franck	Droit et Economie pharmaceutique	86
M	POTHIER	Jean-Claude	Pharmacie officinale	
Mme	ROGNON	Carole	Pharmacie officinale	

Assistants Hospitalo-Universitaire (AHU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	BOUDRY	Augustin	Biomathématiques	
Mme	DERAMOUDT	Laure	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	
M.	GISH	Alexandr	Toxicologie et Santé publique	
Mme	NEGRIER	Laura	Chimie analytique	

Hospitalo-Universitaire (PHU)

	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	DESVAGES	Maximilien	Hématologie	
Mme	LENSKI	Marie	Toxicologie et Santé publique	

Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	BERNARD	Lucie	Physiologie	
Mme	BARBIER	Emeline	Toxicologie	
Mme	COMPAGNE	Nina	Chimie Organique	

Mme	COULON	Audrey	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	
M.	DUFOSSEZ	Robin	Chimie physique	
Mme	FERRY	Lise	Biochimie	

M	HASYEOUI	Mohamed	Chimie Organique	
Mme	HENRY	Doriane	Biochimie	
Mme	KOUAGOU	Yolène	Sciences végétales et fongiques	
M	LAURENT	Arthur	Chimie-Physique	
M.	MACKIN MOHAMOUR	Synthia	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	
Mme	RAAB	Sadia	Physiologie	

Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
Mme	DELOBEAU	Iris	Pharmacie officinale
M	RIVART	Simon	Pharmacie officinale
Mme	SERGEANT	Sophie	Pharmacie officinale
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

LRU / MAST

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
Mme	FRAPPE	Jade	Pharmacie officinale
M	LATRON-FREMEAU	Pierre-Manuel	Pharmacie officinale
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique

CYCLE DE VIE DU DOCUMENT

Version	Modifié par	Date	Principales modifications
1.0		20/02/2020	Création
2.0		02/01/2022	Mise à jour
2.1		21/06/2022	Mise à jour
2.2		01/02/2024	Mise à jour
2.3		15/11/2024	Mise à jour
2.4		18/02/2025	Mise à jour

UFR3S-Pharmacie
L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs

Remerciements

<u>À mon maître de thèse :</u>

Monsieur le Docteur Julie DEMARET
Maitre des Conférences des Universités – Praticien Hospitalier

Je vous remercie très sincèrement de me faire l'honneur d'être le maître de cette thèse. Votre confiance, votre disponibilité et vos précieux conseils durant les enseignements ont grandement contribué à l'aboutissement de ce travail. Je vous suis reconnaissant pour l'intérêt que vous lui avez porté ainsi que pour le temps que vous avez consacré à son encadrement. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude, de mon respect et de ma sincère reconnaissance.

<u>À ma directrice de thèse :</u>

Madame le Docteur Kadiombo BANTUBUNGI-BLUM

Je tiens à vous adresser mes plus sincères remerciements pour avoir accepté de diriger cette thèse. Merci pour votre confiance, votre disponibilité, votre bienveillance et vos précieux conseils tout au long de ce travail. Votre exigence scientifique, votre expertise et votre accompagnement m'ont permis de mener ce projet dans les meilleures conditions. Je vous suis profondément reconnaissant pour le temps que vous m'avez accordé et pour tout ce que vous m'avez appris. Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect et de ma plus sincère gratitude.

<u>À mes assesseurs :</u>

Monsieur le Docteur Benjamin DUMONT

Je vous remercie très sincèrement d'avoir accepté de participer à ce jury et d'évaluer ce travail. C'est un honneur de pouvoir bénéficier de votre expertise et de votre regard critique. Veuillez recevoir l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Madame le Docteur Dao PHAN

Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Je suis très sensible au temps que vous consacrez à l'évaluation de cette thèse ainsi qu'à l'intérêt que vous portez à ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

Je tiens également à remercier :

Monsieur le Docteur Jérémy MAGALON

Je vous remercie sincèrement pour votre accompagnement tout au long de cette année de Master 2. Votre enseignement, votre disponibilité et vos conseils ont été déterminants dans

mon parcours et ont renforcé mon intérêt pour la recherche translationnelle et les thérapies innovantes. Je vous remercie également de me faire l'honneur d'être rapporteur de cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude et de mon respect.

Monsieur le Docteur Kok-Siong CHEN

Je tiens à vous remercier très chaleureusement pour m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire et pour avoir assuré la supervision de mon stage de recherche. Merci pour votre disponibilité, votre patience, votre rigueur scientifique ainsi que pour la confiance que vous m'avez accordée tout au long de ces six mois. Votre encadrement m'a permis de progresser tant sur le plan scientifique que personnel. Ce fut un véritable privilège de travailler à vos côtés.

Monsieur le Professeur Khalid SHAH

Je vous remercie très sincèrement de m'avoir donné l'opportunité d'intégrer votre laboratoire au sein du Center for Stem Cell and Translational Immunotherapy. Réaliser ce stage dans une équipe de renommée internationale a constitué une expérience scientifique et humaine exceptionnelle. Merci pour votre confiance et pour l'opportunité de contribuer aux projets de votre laboratoire. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Toute l'équipe du Center for Stem Cell and Translational Immunotherapy (CSTI)

Je souhaite remercier l'ensemble des chercheurs, post-doctorants, doctorants, ingénieurs et personnels techniques du CSTI pour leur accueil chaleureux, leur disponibilité et leur bienveillance. Merci pour votre aide quotidienne, les nombreux échanges scientifiques, votre esprit d'équipe et la qualité de l'environnement de travail que vous avez su créer. Ces six mois passés à vos côtés resteront une étape marquante de mon parcours, tant sur le plan scientifique qu'humain. Soyez tous assurés de ma plus sincère reconnaissance.

Table des matières

Liste des abréviations **25**

I. Le glioblastome : une maladie à très haut besoin médical **30**

- 1.1. Le cancer : un défi sanitaire mondial 30
  - 1.1.1. Épidémiologie et impact socio-économique 30
  - 1.1.2. Déterminants multifactoriels de la cancérogenèse 31
- 1.2. Spécificité du glioblastome : agressivité, récidive, pronostic, symptôme et caractérisation 32
  - 1.2.1. Présentation clinique et pronostic 32
  - 1.2.2. Classification moléculaire 34
  - 1.2.3. Hétérogénéité tumorale 35
  - 1.2.4. Plasticité phénotypique et adaptation tumorale 36
  - 1.2.5. Infiltration diffuse du parenchyme cérébral et récidive 36
  - 1.2.6. Reprogrammation métabolique du glioblastome 37
- 1.3. Les obstacles biologiques 37
  - 1.3.1. La barrière hémato-encéphalique : un obstacle à l'accès thérapeutique 37
  - 1.3.2. Le microenvironnement tumoral : un obstacle à la réponse immunitaire 38

II. Stratégies thérapeutiques actuelles et leurs limites **41**

- 2.1. Traitements conventionnels 41
  - 2.1.1. Le protocole de Stupp 41
  - 2.1.2. La cavité de post-résection 41
  - 2.1.3. Chimiothérapie et radiothérapie : une efficacité structurellement limitée 42
- 2.2. Immunothérapie 43
  - 2.2.1. Inhibiteurs de checkpoints immunitaires 43
  - 2.2.2. Thérapies cellulaires 44

III. Du cancer ennemi au cancer thérapeutique, émergence d'un nouveau paradigme .. **45**

- 3.1. Le paradoxe du cancer comme source thérapeutique 45
  - 3.1.1. Exploiter la plasticité du glioblastome 45
  - 3.1.2. Les cellules tumorales comme vecteurs thérapeutiques, un ciblage biologique naturel ... 45
- 3.2. Première génération : cellules tumorales atténuées, principe des vaccins autologues irradiés 46
  - 3.2.1. Cellules tumorales irradiées 46
  - 3.2.2. Données cliniques 47
- 3.3. Deuxième génération : GVAX et GM-CSF 48
- 3.4. Troisième génération : « Killer Vaccine » 49

IV. Plateforme proposée : « vaccin off-the-shelf » multifonctionnel **52**

- 4.1. Hypothèse centrale du travail 52
  - 4.1.1. Concept des cellules tumorales thérapeutiques 52
  - 4.1.2. Design des ThTC bifonctionnelles 53
- 4.2. Vers un vaccin universel allogénique 55
  - 4.2.1. Concept « off-the-shelf » 55
  - 4.2.2. Avantages d'une thérapie allogénique 57

V. Validation préclinique **59**

- 5.1. Modèles expérimentaux utilisés 59
  - 5.1.1. Lignées cellulaires 59
  - 5.1.2. Panorama des modèles murins disponibles pour l'évaluation des ThTC 60

- 5.2. Études in vitro 62
  - 5.2.1. Cytotoxicité croisée des ThTC versus cellules tumorales 62
  - 5.2.2. Validation de l'expression et de la sécrétion d'IFNβ et de GM-CSF 64
  - 5.2.3. Évaluation du système de sécurité par ganciclovir 65
- 5.3. Études prophylactiques 67
  - 5.3.1. Modèle orthotopique et protocole de vaccination préventive 67
  - 5.3.2. Détermination de l'efficacité thérapeutique pour le GBM
  - 5.3.3 Profilage immunitaire et modulation du microenvironnement tumoral par les cellules 73

VI. Systèmes de sécurité et contrôle 76

- 6.1. Risques liés aux cellules vivantes modifiées 76
  - 6.1.1. Risque de prolifération incontrôlée 76
  - 6.1.2. Risque mutagène et dérive génomique 76
  - 6.1.3. Risque d'échappement aux kill switches 76
- 6.2. Stratégies de contrôle et systèmes de sécurité 77
  - 6.2.1. Principe d'orthogonalité des systèmes de sécurité 77
  - 6.2.2. Suicide génique HSV-TK/GCV 77
  - 6.2.3. Système iCasp9 78
  - 6.2.4. Système iRIPK3 et nécroptose immunogène 78

VII. Développement translationnel, réglementaire et industriel des ThTC 80

- 7.1. Défis de développement 80
  - 7.1.1. Fabrication GMP 80
  - 7.1.2. Contrôle qualité 80
  - 7.1.3. Scalabilité 80
- 7.2. Défis réglementaires 81
  - 7.2.1. Thérapies cellulaires et ATMP 81
  - 7.2.2. Exigences FDA et EMA 81
- 7.3. Défis cliniques 81
  - 7.3.1. Conception des essais cliniques 81
  - 7.3.2. Sélection des patients 81
  - 7.3.3. Biomarqueurs de réponse 82

VIII. Perspectives industrielles et marché 83

- 8.1. Thérapie cellulaire : état du marché 83
- 8.2. Position du glioblastome 84
- 8.3. Acteurs clés 84
- 8.4. Modèle économique 85

IX. Discussion et Conclusion 90

- 9.1. Apports scientifiques du travail 90
- 9.2. Limites 90
- 9.3. Comparaison avec approches existantes 91
- 9.4. Perspectives futures 94

X. Conclusion générale 96

XI. Références 98

Table des Figures

N°	Titre / Source	Page
Figure 1	Incidence et mortalité du cancer dans le monde, adapté de Bray F. et al. 2024	31
Figure 2	Hallmarks du cancer, adapté de Hanahan D. et al. 2011	32
Figure 3	Aspects du glioblastome en imagerie (scanner et IRM), adapté de Shukla et al. 2017	34
Figure 4	Hétérogénéité et hiérarchie des cellules souches de glioblastome, adapté de Lathia JD. et al.	35
Figure 5	Morphologie fonctionnelle de la barrière hémato-encéphalique, adapté de Liebner S. et al.	40
Figure 6	Ciblage de la marge de résection du glioblastome par nanotechnologies locorégionales, adapté de Kisby T. et al.	42
Figure 7	Méthylation du promoteur MGMT et bénéfice du témozolomide, adapté de Hegi ME. et al. 2005	43
Figure 8	Mécanismes de résistance thérapeutique dans le glioblastome, adapté de Sherman JH. et al.	43
Figure7 bis	Résultats des essais de vaccination tumorale dans le mélanome, adapté de Eggermont AM. et al. 2013	48
Figure8 bis	Efficacité des vaccins tumoraux autologues combinés à la chimiothérapie, adapté de Wheeler et al. 2004	50
Figure 9	Effet protecteur et thérapeutique du vaccin GM-CSF (GVAX) contre le mélanome, adapté de Dranoff G. et al. 1993	49
Figure 10	Action locale de l'interféron-β dans le microenvironnement tumoral, adapté de Jonasch E. et al. 2001	50
Figure 11	Induction de la mort cellulaire immunogène par la combinaison IFN-β/GM-CSF, adapté de Galluzzi L. et al. 2020	51
Figure 12	Systèmes de sécurité intégrés à la plateforme ThTC, adapté de Chen KS. et al. 2026	53
Figure 13	Schéma de ThTC	54
Figure 14	Éradication tumorale confirmée par histologie et imagerie après traitement par ThTC, adapté de Chen KS. et al. 2023	55
Figure 17	Mémoire immunitaire anti-tumorale et protection au rechallenge, adapté de Chen KS. et al.	58
Figure 20	Construction du plasmide	63
Figure 21	Résultats du test de cytotoxicité	63
Figure 22	Résultats du Western Blot	65
Figure 23	Template du test de Ganciclovir	66
Figure 24	Résultats du test de Ganciclovir	67
Figure 25	Plan expérimental prophylactique	69
Figure 26	Plan expérimental in vivo immunologique	71
Figure 27	Plan expérimental in vivo thérapeutique	74
Figure 28	Systèmes suicides dans les thérapies cellulaires anticancéreuses, adapté de Chen K-S, Shah K. 2025	78

Figure 29	Marché mondial des thérapies cellulaires (2018-2030), adapté de Grand View Research	83
Figure 30	Impact de la production délocalisée sur le coût de fabrication des CAR-T, adapté de Harrison et al. 2019	86
Figure 31	Thérapies CAR-T de nouvelle génération pour le glioblastome, adapté de Bernstock JD. et al. 2024	92
Figure 32	Macrophages M1/M2 dérivés de monocytes iPSC et activité anti-tumorale, adapté de Hay I. et al. 2022	93
Figure 33	Virus oncolytiques dans le traitement du glioblastome, adapté de Alomari O. et al. 2025	94

Table des tableaux

N°	Titre	Page

Tableau 1 *(actuellement « Figure 16 »)*	Comparaison des modèles autologue et allogénique pour le développement des ThTC dans le GBM	57
Tableau 2 *(actuellement « Figure 18 »)*	Caractérisation des différentes lignées cellulaires	60
Tableau 3 *(actuellement « Figure 19 »)*	Comparaison des modèles précliniques pour l'évaluation des ThTC dans le GBM	62

ANNEXES

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
4C8	Lignée cellulaire murine de gliome 4C8
AAVS1	Locus génomique « safe harbor » AAVS1 (site d'intégration du virus adéno-associé)
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMM	Autorisation de mise sur le marché
AP1903	Agent dimérisant (rimiducid)
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
ASMR	Amélioration du service médical rendu
ATMP	Advanced Therapy Medicinal Product (médicament de thérapie innovante)
ATP	Adénosine triphosphate
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BLU	Signal de bioluminescence
BTB	Blood-Tumor Barrier (barrière hémato-tumorale)
BTD	Breakthrough Therapy Designation (désignation de thérapie de rupture, FDA)
CAGR	Compound Annual Growth Rate (taux de croissance annuel composé)
CAR	Chimeric Antigen Receptor (récepteur antigénique chimérique)
CAR-NK	Cellule Natural Killer à récepteur antigénique chimérique
CAR-T	Lymphocyte T à récepteur antigénique chimérique
CCL2	C-C motif Chemokine Ligand 2
CD133	Cluster de différenciation 133 (marqueur de cellules souches)
CD19	Cluster de différenciation 19 (marqueur des lymphocytes B)
CD206	Cluster de différenciation 206 (récepteur au mannose, macrophages M2)
CD3	Cluster de différenciation 3 (marqueur des lymphocytes T)
CD34	Cluster de différenciation 34 (progéniteurs hématopoïétiques)
CD4	Cluster de différenciation 4 (lymphocytes T auxiliaires)
CD40	Cluster de différenciation 40 (molécule de co-stimulation)
CD45	Cluster de différenciation 45 (antigène leucocytaire commun)
CD47	Cluster de différenciation 47 (signal « don't eat me »)
CD8	Cluster de différenciation 8 (lymphocytes T cytotoxiques)
CD80	Cluster de différenciation 80 (co-stimulation)
CD86	Cluster de différenciation 86 (co-stimulation)
CE	Marquage CE (Conformité Européenne)
CEPS	Comité économique des produits de santé
CIRC	Centre international de recherche sur le cancer
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMH-I	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
COGS	Cost of Goods Sold (coût de production)
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CQA	Critical Quality Attribute (attribut qualité critique)
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CRISPR-Cas9	CRISPR-associated protein 9 (nucléase guidée par ARN)
CSF-1	Colony-Stimulating Factor 1
CT2A	Lignée cellulaire murine de glioblastome CT2A

CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4
CTS	Central Termination Sequence (vecteur lentiviral)
CXCL12	C-X-C motif Chemokine Ligand 12
CXCR4	C-X-C Chemokine Receptor type 4
DAMPs	Damage-Associated Molecular Patterns (motifs moléculaires associés aux dommages)
DC	Dendritic Cell (cellule dendritique)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (milieu de culture)
E2A	Peptide auto-clivant 2A (origine équine)
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
EF-1α	Elongation Factor 1 alpha (promoteur)
EFS	Promoteur EF-1α court (Elongation Factor 1α Short)
EGF	Epidermal Growth Factor (facteur de croissance épidermique)
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EGFRvIII	Variant III du récepteur de l'EGF
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ELISpot	Enzyme-Linked Immunospot
EMA	European Medicines Agency (Agence européenne des médicaments)
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast Growth Factor
FmC	Rapporteur bioluminescent/fluorescent (firefly luciferase–mCherry)
FOXP3	Forkhead box P3 (facteur de transcription des lymphocytes T régulateurs)
GBM	Glioblastome (glioblastoma multiforme)
GCV	Ganciclovir
GFP	Green Fluorescent Protein (protéine fluorescente verte)
GFP-TC	Cellule tumorale exprimant la GFP
GHS	Groupe homogène de séjour
GL261	Lignée cellulaire murine de glioblastome GL261
GLOBOCAN	Base de données mondiale d'incidence et de mortalité du cancer (CIRC)
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (facteur de stimulation des colonies de granulocytes et macrophages)
GMCSF-TC	Cellule tumorale exprimant le GM-CSF
GMP	Good Manufacturing Practice (bonnes pratiques de fabrication)
GSC	Glioblastoma Stem Cell (cellule souche de glioblastome)
GVAX	Vaccin cellulaire tumoral sécrétant le GM-CSF
GVH	Réaction du greffon contre l'hôte (Graft-versus-Host)
HAS	Haute Autorité de Santé
HBV	Virus de l'hépatite B
HCV	Virus de l'hépatite C
HMGB1	High Mobility Group Box 1
HPV	Papillomavirus humain
HRP	Horseradish Peroxidase (peroxydase de raifort)
HSV	Herpes Simplex Virus
HSV-TK	Thymidine kinase du virus Herpes Simplex

IC50	Concentration inhibitrice médiane (50 %)
ICD	Immunogenic Cell Death (mort cellulaire immunogène)
ICI	Immune Checkpoint Inhibitor (inhibiteur de point de contrôle immunitaire)
IDH	Isocitrate déshydrogénase
IDO	Indoléamine 2,3-dioxygénase
IFIT1	Interferon-Induced protein with Tetratricopeptide repeats 1
IFN	Interféron
IFNβ	Interféron bêta
IFNAR1	Récepteur de l'interféron de type I, sous-unité 1 (Interferon-alpha/beta Receptor 1)
IGTK	Construction transgénique thérapeutique IFNβ–GM-CSF–Thymidine kinase
IL-10	Interleukine 10
IL-12	Interleukine 12
IL-6	Interleukine 6
IND	Investigational New Drug (demande d'essai clinique, FDA)
IRM	Imagerie par résonance magnétique
ISG	Interferon-Stimulated Gene (gène stimulé par l'interféron)
JAK-STAT	Janus Kinase – Signal Transducer and Activator of Transcription
KO	Knock-out (invalidation génique)
LAG-3	Lymphocyte-Activation Gene 3
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LN229	Lignée cellulaire humaine de glioblastome LN229
LOD	Limite de détection
LOQ	Limite de quantification
MGMT	O6-méthylguanine-ADN méthyltransférase
MHC	Major Histocompatibility Complex (complexe majeur d'histocompatibilité)
MHCI	MHC de classe I
MTI	Médicament de thérapie innovante
MX1	MX Dynamin-like GTPase 1 (gène stimulé par l'interféron)
NESTIN	Protéine des filaments intermédiaires (marqueur de cellules souches neurales)
NK	Natural Killer (cellule tueuse naturelle)
NOD-SCID	Non-Obese Diabetic / Severe Combined Immunodeficiency (souris immunodéficientes)
NSG	NOD scid gamma (souche murine immunodéficiente)
OAS1	2'-5'-Oligoadenylate Synthetase 1 (gène stimulé par l'interféron)
OLIG2	Oligodendrocyte transcription factor 2
OMS	Organisation mondiale de la santé
OTS	Off-The-Shelf (prêt à l'emploi)
OTS-ThTC	Cellule tumorale thérapeutique « off-the-shelf »
OV	Oncolytic Virus (virus oncolytique)
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns (motifs moléculaires associés aux pathogènes)
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell (cellule mononucléée du sang périphérique)
PCR	Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
PD-1	Programmed cell Death protein 1
PD-L1	Programmed Death-Ligand 1

PD-L2	Programmed Death-Ligand 2
PVSRIPO	Poliovirus recombinant oncolytique (chimère rhinovirus/poliovirus)
QC	Quality Control (contrôle qualité)
RIPK3	Receptor-Interacting serine/threonine-Protein Kinase 3
RLU	Relative Light Units (unités relatives de luminescence)
RNA-seq	Séquençage de l'ARN (RNA sequencing)
RRE	Rev Response Element (vecteur lentiviral)
SMA560	Lignée cellulaire murine de gliome SMA560
SMR	Service médical rendu
SNC	Système nerveux central
SOX2	SRY-box transcription factor 2 (marqueur de cellules souches)
T2A	Peptide auto-clivant 2A (Thosea asigna)
TAM	Tumor-Associated Macrophage (macrophage associé à la tumeur)
TC	Tumor Cell (cellule tumorale)
TF-1	Lignée cellulaire érythroleucémique humaine TF-1
TGF	Transforming Growth Factor (facteur de croissance transformant)
ThTC	Cellule tumorale thérapeutique (Therapeutic Tumor Cell)
TIGIT	T-cell Immunoreceptor with Ig and ITIM domains
TIL	Tumor-Infiltrating Lymphocyte (lymphocyte infiltrant la tumeur)
TIM-3	T-cell Immunoglobulin and Mucin domain 3
TK	Thymidine kinase
TMB	Tumor Mutational Burden (charge mutationnelle tumorale)
TME	Tumor Microenvironment (microenvironnement tumoral)
TMZ	Témozolomide
TNF	Tumor Necrosis Factor (facteur de nécrose tumorale)
WPRE	Woodchuck hepatitis virus Posttranscriptional Regulatory Element
XCR1	X-C motif Chemokine Receptor 1
ZO	Zonula Occludens (protéines des jonctions serrées)

I.Le glioblastome : une maladie à très haut besoin médical

1.1. Le cancer : un défi sanitaire mondial

1.1.1. Épidémiologie et impact socio-économique

Le cancer constitue l'un des défis sanitaires les plus pressants du XXIe siècle. A l'échelle mondiale, il représente la deuxième cause de mortalité après les maladies cardiovasculaires, et sa prévalence ne cesse de croître sous l'effet conjugué du vieillissement démographique de la croissance de la population mondiale, et de la persistance de facteurs de risque comportementaux et environnementaux profondément ancrés dans les modes de vie contemporains.

Selon les estimations du Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) publiées dans le rapport GLOBOCAN 2022, on dénombrait environ 20 millions de nouveaux cas de cancer diagnostiqués dans le monde au cours de cette seule année, pour près de 9,7 millions de décès[1]. Ces chiffres, déjà considérables, sont appelés à s'aggraver : les projections épidémiologiques anticipent une augmentation à plus de 35 millions de nouveaux cas annuels d'ici 2050[1], principalement en raison du vieillissement et de la croissance de la population mondiale. En Europe, le cancer représente la deuxième cause de décès après les maladies cardiovasculaires, avec environ 2,7 millions de nouveaux cas et 1,3 million de décès recensés en 2022 ; en France, il constitue la première cause de mortalité prématurée, avec près de 433 000 nouveaux cas diagnostiqués cette même année selon les données de Santé Publique France[2]. Cette trajectoire est particulièrement marquée dans les pays à revenus faibles et intermédiaires, où l'urbanisation rapide, l'adoption de modes de vie occidentaux et un accès encore limité aux outils de dépistage précoce et aux thérapies modernes concentrent une part croissante de la charge mondiale de la maladie[2].

Le terme "cancer" désigne en réalité plusieurs centaines de pathologies distinctes, dont les mécanismes moléculaires, les profils de résistance thérapeutique et les dynamiques évolutives divergent considérablement. Cette complexité constitue l'un des obstacles fondamentaux au développement de stratégies thérapeutiques universellement efficaces *(Figure 1)*.

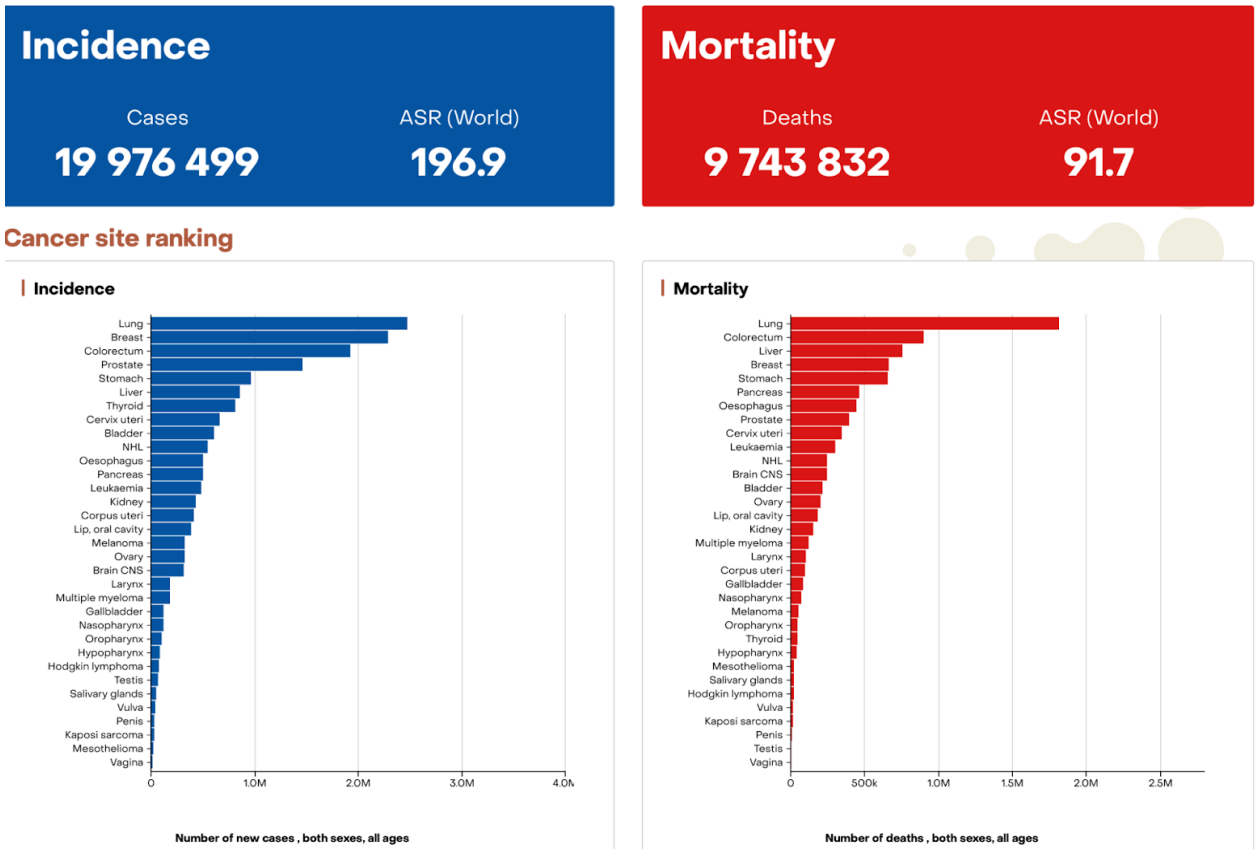


Figure 1 :*Incidence et mortalité du cancer dans le monde, adapté de Bray F. et al. 2024* [1]

1.1.2. Déterminants multifactoriels de la cancérogenèse

L'émergence d'un cancer résulte d'une accumulation progressive d'altérations génétiques mutations affectant directement la séquence d'ADN et épigénétiques modifications de l'expression des gènes sans altération de la séquence nucléotidique (méthylation de l'ADN, modifications des histones) au sein d'une cellule somatique, qui acquiert progressivement les caractéristiques d'une cellule néoplasique maligne. Pour rendre compte de cette transformation, Hanahan et Weinberg ont proposé le cadre conceptuel des Hallmarks of Cancer : un ensemble de capacités biologiques fondamentales que toute cellule cancéreuse acquiert au cours de son évolution, parmi lesquelles la prolifération autonome, l'échappement aux mécanismes de suppression tumorale, la résistance à l'apoptose (mort cellulaire programmée), l'induction de l'angiogenèse (formation de nouveaux vaisseaux sanguins au profit de la tumeur), l'activation de l'invasion tissulaire et de la dissémination métastatique, la dérégulation du métabolisme cellulaire et la capacité d'échapper à la surveillance immunitaire[3]. La mise à jour de ce cadre en 2022 a enrichi ces caractéristiques en intégrant la plasticité phénotypique et l'évolution tumorale sous pression sélective[4].

Sur le plan étiologique, les facteurs de risque carcinogènes sont multiples et intriqués : expositions environnementales (tabac, radiations ionisantes, agents chimiques industriels), facteurs

infectieux (virus HPV, HBV/HCV, H. pylori), facteurs comportementaux (alimentation, sédentarité, consommation d'alcool), prédispositions génétiques héréditaires (mutations BRCA1/2, syndrome de Lynch) et vieillissement cellulaire intrinsèque[5].

La multiplicité et l'intrication de ces déterminants rendent la prévention primaire particulièrement complexe et soulignent la nécessité de développer des approches thérapeutiques capables de s'adapter à la diversité moléculaire des tumeurs, notamment dans les contextes où les ressources de prise en charge restent limitées *(Figure 2)*.

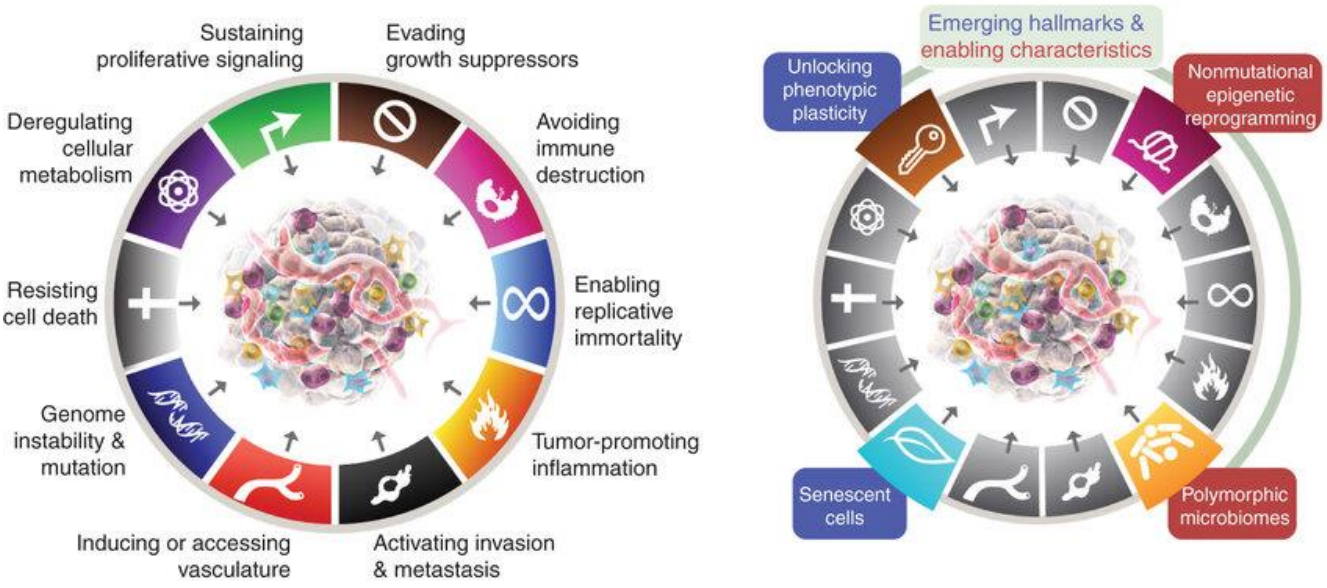


Figure 2 : *Hallmarks du cancer, adapté de Hanahan D. et al2011*[3]

1.2. Spécificité du glioblastome : agressivité, symptôme et caractérisation

1.2.1. Présentation clinique et pronostic

Parmi l'ensemble des tumeurs malignes, les tumeurs cérébrales primitives occupent une place particulière en raison de contraintes anatomiques et biologiques spécifiques qui les rendent exceptionnellement difficiles à traiter. Au sein de cette catégorie, le glioblastome représente la forme la plus agressive et la plus fréquente, ce qui en fait un modèle d'étude privilégié pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques et justifie qu'on s'y intéresse spécifiquement dans ce travail.

La classification OMS 2021 a profondément remanié la taxonomie des gliomes en intégrant des critères moléculaires aux critères histologiques. Le glioblastome multiforme (GBM), désormais désigné sous le terme « glioblastome IDH-wildtype » dans la classification OMS 2021 des tumeurs du système nerveux central[14], représente la tumeur cérébrale maligne la plus fréquente et la plus agressive chez l'adulte. Il est classé en grade 4 selon la nouvelle nomenclature

OMS, reflétant son caractère hautement invasif, sa croissance rapide et son pronostic extrêmement sévère. Il se caractérise par l'absence de mutation IDH (Isocitrate Déshydrogénase : enzyme du cycle de Krebs dont la mutation définit un sous-groupe de gliomes de meilleur pronostic). Comme l'illustre le tableau ci-dessous *(Figure 3)*, le GBM se présente à l'imagerie comme une masse hétérogène avec une prise de contraste périphérique irrégulière, une nécrose centrale et un œdème péri-lésionnel étendu, aspects directement liés à sa biologie agressive : néovascularisation anarchique, instabilité vasculaire et infiltration diffuse du parenchyme cérébral. Le glioblastome présente un pronostic sombre avec une survie médiane d'environ 14 à 18 mois malgré un traitement multimodal, et une survie à 5 ans inférieure à 10 %.

Sur le plan épidémiologique, le GBM représente environ 14 à 16 % de l'ensemble des tumeurs cérébrales primitives et près de 50 % des gliomes malins[15]. Son incidence est estimée à 3,2 cas pour 100 000 habitants par an dans les pays occidentaux, avec une légère prédominance masculine (sex-ratio de 1,6) et un pic d'incidence entre 55 et 75 ans[15]. Bien que rare en valeur absolue comparé aux grandes pathologies cancéreuses, le GBM concentre une charge de morbidité et de mortalité disproportionnée en raison de l'absence quasi-totale de traitement curatif efficace.

Sur le plan clinique, le GBM se manifeste généralement par des céphalées progressives, des déficits neurologiques focaux (hémiparésie, aphasie, troubles visuels selon la localisation), des crises épileptiques de novo, et des signes d'hypertension intracrânienne (nausées, vomissements, œdème papillaire). Ces symptômes évoluent le plus souvent sur quelques semaines à quelques mois avant le diagnostic, témoignant de la cinétique de croissance rapide de la tumeur[51]. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) avec injection de gadolinium constitue l'examen de référence, montrant typiquement une masse prenant le contraste de manière hétérogène avec une nécrose centrale, entourée d'un œdème péri-lésionnel souvent étendu.

La récidive du GBM est quasi-universelle, survenant le plus souvent dans les 6 à 9 mois suivant la fin du traitement de première ligne, et dans plus de 90 % des cas en situation locorégionale, à moins de 2 cm des berges de la résection initiale[22]. *(Figure 3)*

	CT scan (scanner cérébral) 1. Le scanner cérébral met en évidence une large masse hétérogène localisée dans le lobe frontal droit. 2. Cette lésion exerce un effet de masse important sur les structures cérébrales adjacentes. 3. On observe un déplacement de la ligne médiane vers la gauche, témoignant d'une pression intracrânienne élevée. 4. Cet aspect est compatible avec une tumeur cérébrale agressive de type glioblastome.

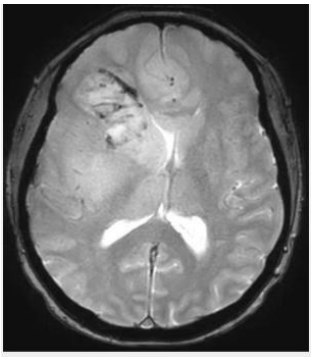
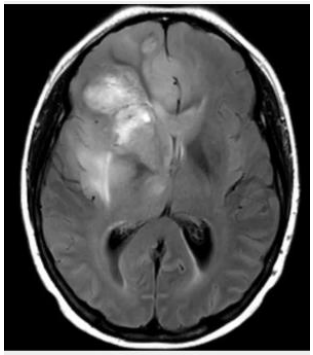
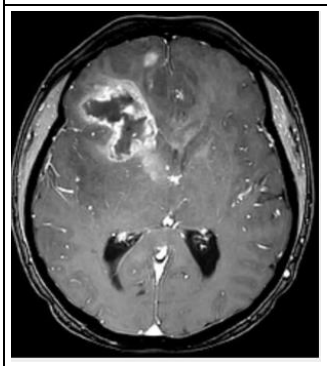
	IRM FLAIR 1. L'image FLAIR montre une masse hétérogène centrée dans le lobe frontal droit et les ganglions de la base. 2. Un hypersignal étendu entoure la lésion, correspondant à un œdème et à une infiltration tumorale. 3. Cet "anneau FLAIR" s'étend au corps calleux et à la région insulaire, traduisant un caractère infiltrant. 4. Ces caractéristiques sont typiques d'un gliome de haut grade tel que le glioblastome.
	IRM GRE (susceptibility) 1. L'image GRE révèle plusieurs foyers d'hyposignal intratumoraux. 2. Ces zones correspondent à des artefacts de susceptibilité liés à la présence de produits sanguins. 3. Elles traduisent des micro-hémorragies intratumorales ou des dépôts d'hémosidérine. 4. Cet aspect reflète la forte néovascularisation et l'instabilité vasculaire de la tumeur.
	IRM T1 avec gadolinium (T1CE) 1. L'IRM T1 avec contraste montre une prise de contraste périphérique irrégulière. 2. Le centre de la lésion apparaît non rehaussé, compatible avec une nécrose tumorale. 3. Plusieurs zones de rehaussement supplémentaires sont visibles dans la région frontale et ganglionnaire. 4. Cet aspect en anneau avec nécrose centrale est typique du glioblastome.

Figure 3 : *Aspects du glioblastome en imagerie (scanner et IRM), adapté de Shukla et al. 2017* [52]

1.2.2. Classification moléculaire

L'agressivité exceptionnelle du GBM repose sur plusieurs caractéristiques biologiques intrinsèques qui en font un adversaire thérapeutique redoutable. Ces caractéristiques sont au nombre de quatre : (a) une hétérogénéité intra-tumorale extrême, sous-tendue par des sous-populations cellulaires hiérarchisées ; (b) une plasticité phénotypique permettant aux cellules tumorales de changer d'état fonctionnel sous pression thérapeutique ; (c) une infiltration diffuse du parenchyme cérébral rendant toute résection complète illusoire ; et (d) une dérégulation

métabolique profonde favorisant la survie en environnement hostile. Chacune de ces caractéristiques est détaillée ci-après. *(Figure 4)*

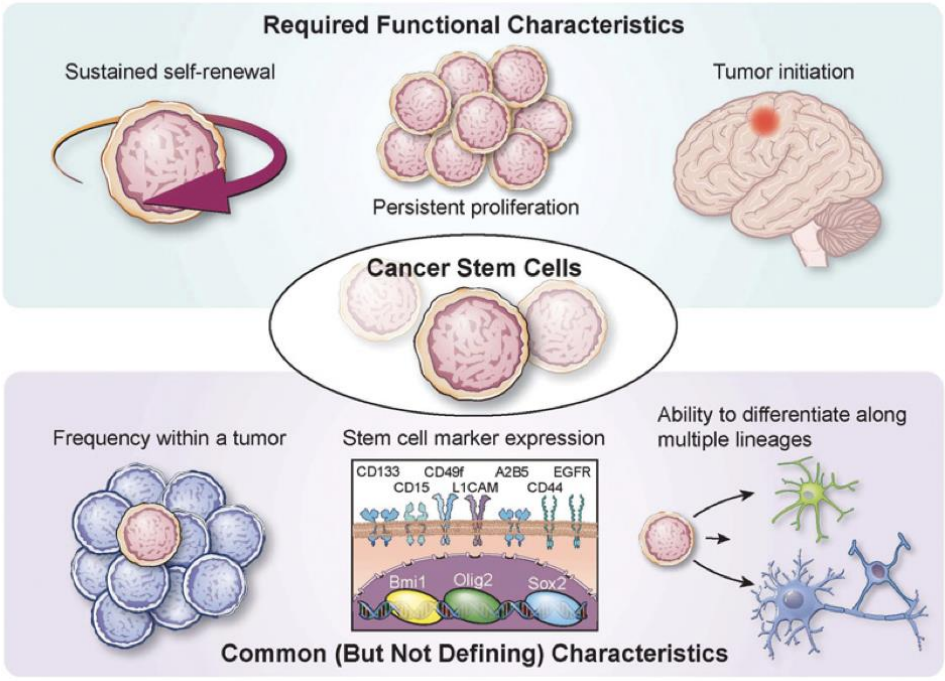


Figure 4 : *Hétérogénéité et hiérarchie des cellules souches de glioblastome, adapté de Lathia JD et al.* [17]

1.2.3. Hétérogénéité tumorale

L'hétérogénéité intra-tumorale du GBM est parmi les plus élevées de tous les cancers solides. Pour comprendre cette notion, il convient de définir ce que l'on entend par sous-populations cellulaires : il s'agit de groupes de cellules coexistant au sein d'une même tumeur, partageant un ancêtre commun mais ayant acquis, au fil des divisions et des pressions sélectives, des profils génomiques (ensemble des variations de la séquence d'ADN), transcriptomiques (ensemble des gènes effectivement exprimés à un moment donné) et épigénétiques (modifications de l'expression des gènes sans altération de la séquence d'ADN, comme la méthylation ou les modifications des histones) distincts. Ces sous-populations ne coexistent pas de manière anarchique : elles s'organisent en une hiérarchie dynamique dominée par les cellules souches de glioblastome (GSC, Glioblastoma Stem Cells)[16].
Les GSC sont caractérisées par l'expression de marqueurs spécifiques : CD133 (glycoprotéine membranaire utilisée comme marqueur de surface des cellules souches cancéreuses), SOX2 (facteur de transcription essentiel au maintien de la pluripotence et de l'autorenouvellement cellulaire), OLIG2 (facteur de transcription impliqué dans la différenciation oligodendrogliale et le maintien de l'identité des GSC) et NESTIN (filament intermédiaire du cy-

tosquelette exprimé dans les cellules souches neurales et progénitrices). Ces cellules présentent quatre propriétés fondamentales : des capacités d'auto-renouvellement (aptitude à se diviser indéfiniment en générant des cellules identiques à elles-mêmes), une différenciation multilinéaire (capacité à donner naissance à plusieurs types cellulaires distincts au sein de la tumeur), une résistance accrue aux traitements conventionnels (chimiothérapie, radiothérapie) et une aptitude à reconstituer l'intégralité de la masse tumorale après thérapie[17]. Elles sont considérées comme le principal moteur des récidives post-thérapeutiques.

1.2.4. Plasticité phénotypique et adaptation tumorale

La plasticité phénotypique est une autre caractéristique fondamentale du GBM. Il convient ici de distinguer clairement la plasticité phénotypique de la différenciation classique : la différenciation est un processus unidirectionnel et irréversible, par lequel une cellule souche acquiert progressivement l'identité d'un type cellulaire défini et stable. La plasticité phénotypique, en revanche, est un processus bidirectionnel et réversible : les cellules tumorales peuvent changer d'état fonctionnel sans altération permanente de leur génome, et revenir à un état antérieur sous l'effet de nouvelles pressions environnementales ou thérapeutiques.
Sous pression thérapeutique, les cellules de GBM peuvent effectuer des transitions entre différents états phénotypiques reconnus : l'état mésenchymateux (caractérisé par des propriétés migratoires, invasives et de résistance thérapeutique accrues, associé au pronostic le plus défavorable), l'état pro-neural (associé à une différenciation neuronale partielle et à un pronostic relatif meilleur) et l'état classique (caractérisé notamment par des amplifications du récepteur EGFR, récepteur du facteur de croissance épidermique impliqué dans la prolifération cellulaire). Ces cellules peuvent également réactiver des programmes transcriptionnels embryonnaires, c'est-à-dire des ensembles de gènes normalement actifs durant le développement fœtal mais silencieux dans les cellules adultes leur permettant d'acquérir de nouvelles propriétés invasives et résistantes[18]. Cette plasticité, sous-tendue par des mécanismes épigénétiques dynamiques, rend insuffisante toute stratégie thérapeutique ciblant un phénotype unique.

1.2.5. Infiltration diffuse du parenchyme cérébral et récidive

L'infiltration diffuse du parenchyme cérébral par les cellules de GBM constitue l'une des caractéristiques les plus problématiques sur le plan chirurgical et thérapeutique. Contrairement à de nombreuses tumeurs solides qui forment une masse relativement bien délimitée, les cellules de GBM migrent activement le long des fibres de myéline (gaines isolantes entourant les axones neuronaux, qui servent de voies de migration préférentielles aux cellules tumorales), des vaisseaux sanguins et des espaces péri-cellulaires, jusqu'à plusieurs centimètres au-delà des marges visibles en imagerie[19]. Ce phénomène rend illusoire toute résection macroscopiquement complète.
Cette infiltration est directement à l'origine de la récidive définie comme la réapparition de la tumeur après traitement quasi-universelle du GBM. Les cellules tumorales ayant infiltré le pa-

renchyme sain au-delà des marges de résection échappent à la fois à la chirurgie et à la radiothérapie, et constituent le point de départ des rechutes. La récidive survient le plus souvent dans les 6 à 9 mois suivant la fin du traitement de première ligne, et dans plus de 90 % des cas en situation locorégionale, à moins de 2 cm des berges de la résection initiale[22].

1.2.6. Reprogrammation métabolique du glioblastome

Le métabolisme tumoral du GBM est profondément remanié. La caractéristique centrale en est l'effet Warburg : phénomène par lequel les cellules tumorales préfèrent produire de l'énergie par glycolyse anaérobie, dégradation du glucose en lactate même en présence d'oxygène plutôt que par la phosphorylation oxydative mitochondriale, pourtant plus efficace énergétiquement. S'y ajoutent une altération de la respiration mitochondriale, l'exploitation des acides aminés et des lipides comme sources d'énergie alternatives, et une production accrue de lactate qui acidifie le microenvironnement tumoral et favorise l'invasion ainsi que la prolifération des cellules tumorales. Ces adaptations métaboliques contribuent à la résistance aux agents cytotoxiques et à la survie dans des environnements hypoxiques (pauvres en oxygène)[23].

1.3 Les obstacles biologiques

1.3.1 La barrière hémato-encéphalique : un obstacle à l'accès thérapeutique

Au-delà des caractéristiques intrinsèques des cellules tumorales décrites précédemment, le succès de toute stratégie thérapeutique dépend également de deux facteurs externes à la cellule tumorale elle-même : la capacité d'un traitement à atteindre physiquement la tumeur, et sa capacité à mobiliser le système immunitaire une fois sur place. Ces deux dimensions : accès physique et environnement immunitaire sont abordées successivement.

La barrière hémato-encéphalique (BHE) constitue l'une des structures biologiques les plus sophistiquées de l'organisme. Elle assure la protection du système nerveux central (SNC) en régulant de manière sélective les échanges entre le compartiment vasculaire et le parenchyme cérébral. Sur le plan structural, la BHE est formée par les cellules endothéliales des capillaires cérébraux, reliées entre elles par des jonctions serrées (tight junctions : structures protéiques, claudine-5, occludine, protéines ZO scellant l'espace entre deux cellules adjacentes et empêchant le passage paracellulaire de molécules)[26]. Ces cellules endothéliales sont étroitement associées aux péricytes (cellules contractiles entourant les capillaires, impliquées dans la régulation du débit sanguin et le maintien de l'intégrité de la barrière), aux astrocytes péri-capillaires (cellules gliales dont les prolongements enveloppent les vaisseaux) et à la lame basale, l'ensemble formant l'unité neurovasculaire[26].

Cette architecture confère à la BHE intacte une imperméabilité quasi totale aux molécules hydrophiles de poids moléculaire supérieur à 400–500 Da, aux protéines, aux anticorps et aux

cellules immunitaires. Seules les petites molécules liposolubles, certains gaz et des substrats reconnus par des transporteurs actifs peuvent la franchir physiologiquement[27].

Cette sélectivité, essentielle à la protection du cerveau, devient un obstacle majeur dès qu'il s'agit de traiter une tumeur cérébrale. La quasi-totalité des agents pharmacologiques actifs en oncologie systémique se heurte à cette barrière. Les anticorps monoclonaux (trastuzumab, bevacizumab, nivolumab) sont pratiquement incapables d'atteindre des concentrations thérapeutiques dans le SNC[28]. Les thérapies cellulaires de type CAR-T, dont le trafic vers les sites tumoraux est déjà complexe dans les cancers systémiques, se heurtent à une imperméabilité supplémentaire dans le contexte cérébral[29]. Même les petites molécules comme les inhibiteurs de tyrosine kinase, réputées pour leur bonne biodisponibilité orale, sont souvent substrats des pompes d'efflux (protéines membranaires notamment la P-glycoprotéine et les protéines MRP qui expulsent activement les molécules étrangères hors des cellules endothéliales), ce qui les exclut activement du compartiment cérébral[30].

On pourrait penser que la tumeur elle-même résout ce problème : en effet, la croissance tumorale induit une perturbation significative de la BHE dans les régions de forte densité cellulaire, donnant naissance à ce que certains auteurs qualifient de barrière hémato-tumorale (BTB, Blood-Tumor Barrier)[31], une BHE altérée, avec jonctions serrées dégradées et néoangiogenèse produisant des vaisseaux anormaux et hyper perméables.

Cette perturbation ne reste cependant ni uniforme ni suffisante pour permettre une délivrance thérapeutique efficace, pour trois raisons principales. Premièrement, les régions d'infiltration diffuse, qui concentrent précisément les GSC responsables des récidives (cf. section 1.1.5), maintiennent souvent une BHE relativement intacte, protégeant ainsi les cellules les plus dangereuses des agents thérapeutiques circulants[31].

Deuxièmement, même dans les zones de BTB perturbée, la distribution intratissulaire des agents reste hétérogène en raison d'une pression interstitielle élevée et d'une organisation vasculaire chaotique[32].

Troisièmement, la surexpression des pompes d'efflux multi drogues persiste dans les cellules de GBM elles-mêmes, réduisant l'accumulation intracellulaire des agents même lorsqu'ils parviennent à atteindre la tumeur[30].

La BHE/BTB constitue donc une contrainte incontournable que toute stratégie thérapeutique destinée au GBM doit intégrer qu'il s'agisse de concevoir des agents capables de la franchir (nanoparticules, liposomes ciblés, vecteurs viraux), d'exploiter des voies d'administration alternatives (intrathécale, convection-enhanced delivery), ou de recourir à des cellules vivantes dotées d'un tropisme naturel pour le tissu cérébral.

1.3.2 Le microenvironnement tumoral : un obstacle à la réponse immunitaire

Même lorsqu'un agent thérapeutique parvient à atteindre la tumeur, son efficacité dépend encore de sa capacité à mobiliser une réponse immunitaire anti-tumorale ce qui constitue, dans le GBM, un second défi majeur. Le microenvironnement tumoral (TME, Tumor Microenvironment), c'est-à-dire l'ensemble des cellules non tumorales, des molécules solubles (cytokines, chimiokines) et des composants matriciels entourant les cellules cancéreuses y est en effet profondément immunosuppresseur, ce qui explique en grande partie l'échec des immunothérapies dans cette pathologie.

Cette immunosuppression repose d'abord sur un ensemble de cellules immunitaires dysfonctionnelles. Les macrophages associés à la tumeur (TAM, Tumor-Associated Macrophages) représentent 30 à 50 % de la masse tumorale et adoptent massivement un phénotype M2 phénotype anti-inflammatoire et pro-réparateur, à l'opposé du phénotype M1 pro-inflammatoire et anti-tumoral sous l'influence de cytokines sécrétées par les cellules de GBM (IL-10, TGF-β, CSF-1, CCL2). Une fois polarisés en M2, ces TAM produisent à leur tour des cytokines immunosuppressives, les ligands PD-L1/PD-L2 et des facteurs pro-angiogéniques, entretenant ainsi un cercle vicieux[33],[34].

Les lymphocytes T infiltrant la tumeur (TIL, Tumor-Infiltrating Lymphocytes) sont quant à eux rares et présentent un phénotype d'épuisement (exhaustion) : ils surexpriment des récepteurs inhibiteurs PD-1, TIM-3, LAG-3 et TIGIT qui, une fois activés par leurs ligands, bloquent leur capacité de prolifération et de destruction des cellules tumorales[35].

Les cellules dendritiques, normalement chargées de capter les antigènes tumoraux et de les présenter aux lymphocytes T pour déclencher une réponse adaptative, sont quasi absentes, leur maturation étant activement inhibée par l'IL-10 et le VEGF[36]. Enfin, les cellules NK (Natural Killer), capables en théorie de détruire les cellules tumorales sans reconnaissance antigénique préalable, voient leur cytotoxicité profondément supprimée[37].

Ce dysfonctionnement cellulaire repose sur des mécanismes moléculaires précis, qui constituent autant de cibles thérapeutiques potentielles. Les cellules tumorales sécrètent un cocktail immunosuppresseur synergique : le TGF-β et l'IL-10 en sont les cytokines centrales[38] ; la surexpression de PD-L1 à la surface des cellules tumorales paralyse les lymphocytes T activés en se liant à leur récepteur PD-1[39] ; la déplétion en tryptophane via l'enzyme IDO (Indoleamine 2,3-dioxygénase, qui catabolise cet acide aminé indispensable à la prolifération lymphocytaire), le signal CD47 anti-phagocytose (signal « don't eat me » empêchant la destruction des cellules tumorales par les macrophages) et l'accumulation de lymphocytes T régulateurs (Treg) FOXP3+ (sous-population lymphocytaire suppressive de l'immunité anti-tumorale) complètent ce tableau[40].

S'ajoute à cela une immunoédition processus par lequel la tumeur, sous pression du système immunitaire, sélectionne au cours de son évolution les clones cellulaires les moins reconnaissables se traduisant par une perte d'expression des molécules du CMH-I (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I, indispensables à la présentation des antigènes tumoraux aux lymphocytes T cytotoxiques CD8+) et par une faible charge mutationnelle générant peu de néoantigènes[41],[42].

L'ensemble de ces mécanismes explique pourquoi le GBM est considéré comme un archétype des tumeurs dites « froides » (cold tumors) : des tumeurs peu infiltrées par les lymphocytes T et donc résistantes aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaire, qui ont pourtant révolutionné le traitement d'autres cancers[11]. Convertir une tumeur froide en tumeur « chaude » (hot tumor), en conséquence densément infiltrée par des lymphocytes T cytotoxiques actifs nécessiterait donc d'agir simultanément sur plusieurs fronts : repolariser les TAM vers un phénotype M1, restaurer la maturation des cellules dendritiques, recruter des lymphocytes T cytotoxiques fonctionnels, et lever l'ensemble des mécanismes suppresseurs décrits ci-dessus[43]. *(Figure 5)*

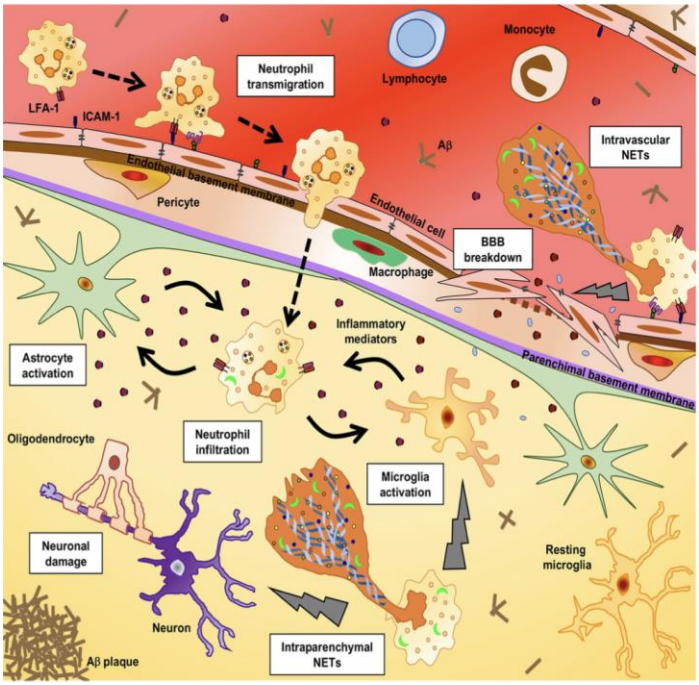


Figure 5 : *Morphologie fonctionnelle de la barrière hémato-encéphalique, adapté de Liebner S. et al.* [28]

II.Stratégies thérapeutiques actuelles et leurs limites

2.1 Traitements conventionnels

2.1.1. Le protocole de Stupp

Le traitement standard du GBM nouvellement diagnostiqué demeure fondé sur le protocole publié par Stupp et al en 2005 dans le New England Journal of Medecine, associant résection chirurgicale maximale, suivie d'une radiochimiothérapie concomitante au témozolomide (TMZ) pendant 6 semaines, puis TMZ adjuvante pendant 6 cycles[24]. Ce protocole a permis d'améliorer la médiane de survie globale de 12,1 mois à 14,6 mois avec un taux de survie à 2 ans de 26,5 %[24] . Ces résultats modestes n'ont été que marginalement dépassés en deux décennies de recherche.
La récidive du GBM est quasi-universelle, survenant dans les 6 à 9 mois post-traitement, à moins de 2 cm des berges de résection dans plus de 90 % des cas[28], du fait de l'infiltration diffuse du parenchyme par des cellules tumorales échappant à la chirurgie et à la radiochimiothérapie. En récidive, aucun traitement n'existe : le bevacizumab contrôle les symptômes et l'œdème péritumoral sans bénéfice en survie globale[29], et la réintervention chirurgicale comme la ré-irradiation stéréotaxique restent palliatives. Ces échecs cumulés appellent à repenser la prise en charge du GBM au-delà des approches conventionnelles, vers des stratégies ciblant simultanément les multiples mécanismes de résistance.

2.1.2. La cavité post-résection

Une voie d'accès supplémentaire, propre au contexte chirurgical du GBM, mérite d'être mentionnée : la cavité de résection (resection cavity), c'est-à-dire l'espace laissé dans le parenchyme cérébral après l'ablation chirurgicale de la masse tumorale principale. Cette cavité représente un site d'intérêt majeur pour l'administration locale de traitements, car elle permet de s'affranchir partiellement de la BHE : un agent thérapeutique déposé directement dans la cavité

sous forme de wafer imprégné (tel que le Gliadel®, implant de carmustine), de gel, de dispositif à libération prolongée ou de cellules vivantes diffuse directement dans le tissu péri-cavitaire sans avoir à traverser l'endothélium vasculaire. C'est précisément dans cette zone péri-cavitaire que se concentre la majorité des récidives, puisqu'elle correspond à la marge d'infiltration où persistent les cellules tumorales résiduelles et les GSC ayant échappé à la résection (cf. section 1.2.3C). La cavité de résection constitue donc à la fois le site anatomique le plus exposé au risque de récidive et la fenêtre d'administration la plus directe pour une thérapie locorégionale une dualité qui en fait un terrain d'application privilégié pour les approches reposant sur des cellules vivantes à tropisme cérébral. *(Figure 6)*

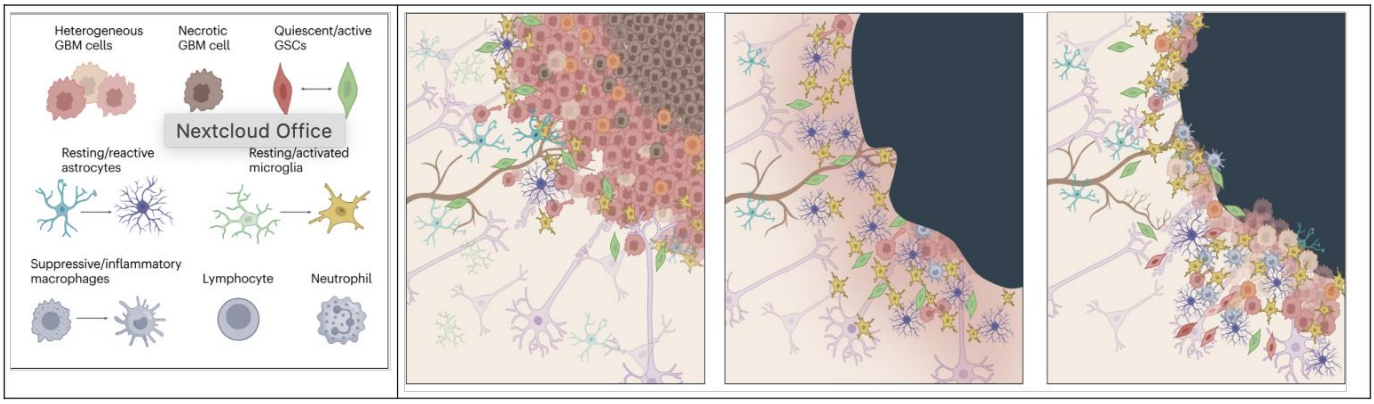


Figure 6 : *Ciblage de la marge de résection du glioblastome par nanotechnologies locorégionales, adapté de Kisby T. et al.* [60]

2.1.3. Chimiothérapie et radiothérapie : une efficacité structurellement limitée

Comme nous l'avons notifié, le traitement standard du GBM repose sur trois piliers : chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie dont chacun se heurte à des obstacles biologiques fondamentaux qui expliquent l'universalité de la récidive.

La résection chirurgicale maximale constitue le pilier standard thérapeutique, mais d'emblée compromise : aucune exérèse, aussi large soit-elle, ne peut éliminer la totalité des cellules tumorales sans provoquer un déficit neurologique inacceptable[22].

Le témozolomide (TMZ), agent alkylant de référence, exerce son effet cytotoxique en induisant des lésions de méthylation sur la guanine en positionO6, générant des mésappariements réplicatifs et une activation des voies apoptotiques[24]. Son efficacité clinique est cependant largement conditionnée par le statut de la O6-méthylguanine-ADN méthyltransférase (MGMT), enzyme de réparation qui contre directement l'alkylation induite. Seuls les patients dont le promoteur MGMT est méthylé entraînant une répression transcriptionnelle de l'enzyme tirent un bénéfice significatif du TMZ, avec une survie globale de 21,7 mois conre 12,7 mois chez les non méthylés[27]. Or, cette méthylation ne concerne qu'environ 40 à 45 % des GBM IDH-wildtype [21].

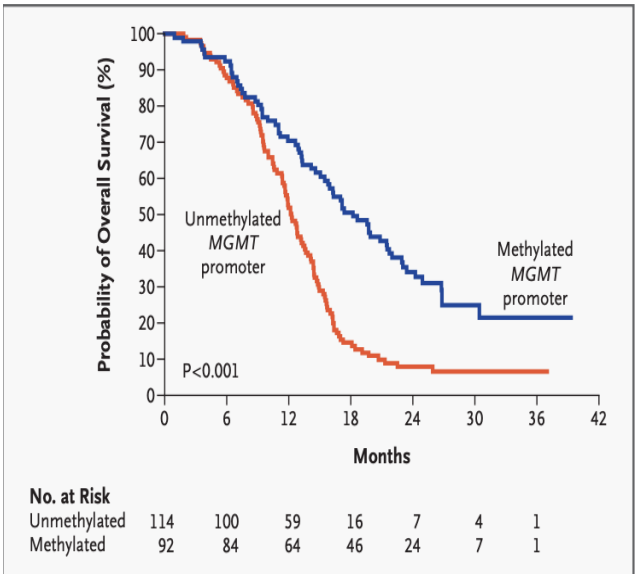


Figure 7 : *Méthylation du promoteur MGMT et bénéfice du témozolomide, adapté de Hegi ME. et al. 2005*[7]

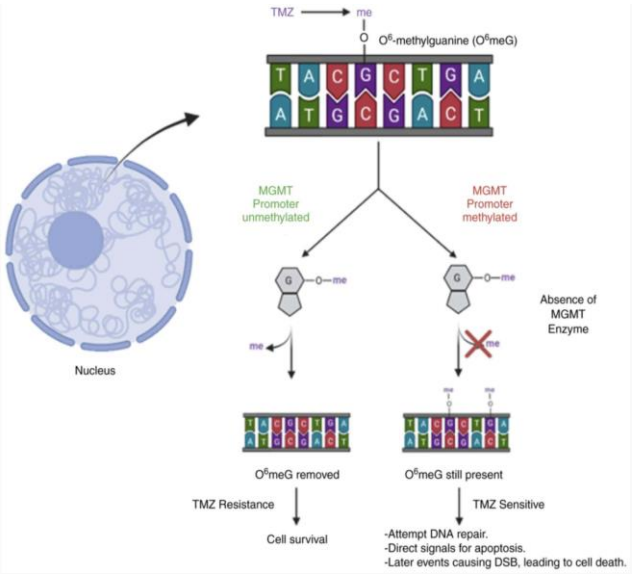


Figure 8 : *Mécanismes de résistance thérapeutique dans le glioblastome, adapté de Sherman JH. et al.*

La radiothérapie post-chirurgicale (60Gy) fractionnés en 30 séances sur 6 semaines[24] apporte un bénéfice en survie démontré, mais se heurte aux mêmes écueils biologiques. Les GSC réparent préférentiellement les cassures double-brin via la recombinaison homologue et survivent à des doses d'irradiation létales pour les cellules tumorales différenciées[7]. L'hypoxie intratumorale, caractéristique du microenvironnement des GBM, réduit par ailleurs la production d'espèces réactives de l'oxygène nécessaires à l'effet radiosensibilisant[23]. La récidive post-radiothérapie présente un phénotype aggravé : la pression sélective exercée par l'irradiation favorise les sous-populations les plus radiorésistantes et une induit une plasticité phénotypique accrue, avec adoption d'états transcriptionnels mésenchymateux associés à l'invasion et à la résistance thérapeutique[21.]

2.2. Immunothérapie

2.1.1. Inhibiteurs de checkpoints immunitaires

L'immunothérapie oncologique a transformé le pronostic de cancers jusqu'alors incurables, en levant la paralysie fonctionnelle des lymphocytes T au sein du microenvironnement tumoral[9,10]. Le GBM est pourtant resté remarquablement réfractaire à l'ensemble de ces approches, révélant la profondeur des obstacles immunobiologiques qui lui sont propres.

Premièrement, les anticorps anti-PD-1 (nivolumab, pembrolizumab), anti-PD-L1 et anti-CTLA-4 (ipilimumab) exercent leur effet en bloquant les interactions récepteur-ligand inhibitrices qui maintiennent les lymphocytes T dans un état d'épuisement[9]. Dans le GBM, ces agents ont échoué de manière répétée : les essais CheckMate 143, CheckMate 498 et CheckMate

548[23,24] n'ont amélioré ni la survie sans progession ni la survie globale. Ces échecs s'expliquent par la nature « froide » du GBM, par opposition aux tumeurs « chaudes », les tumeurs chaudes (mélanome, cancer du poumon, cancer du sein) se caractérisent par une infiltration lymphocytaire abondante en CD8+, une charge mutationnelle élevée générant de nombreux néoantigènes. Le GBM présente à l'inverse une faible infiltration lymphocytaire T, peu de néoantigènes[42], une quasi-absence de cellules dendritiques matures[36] et une immunosuppression entretenue par les cellules tumorales[33,34]. Les rares lymphocytes T présents restent impuissants face à la multiplicité des mécanismes suppressifs superposés[11]. La BHE, également constitue un obstacle supplémentaire, les anticorps de grande taille (150 kDa) ne franchissant la BHE qu'en concentrations infra-thérapeutiques[28].

2.1.2. Thérapies cellulaires

Deuxièment, les CAR-T cells : lymphocytes T génétiquement modifiés pour exprimer un récepteur chimérique couplant reconnaissance antigénique et signalisation activatrice ont démontré des rémissions remarquables dans les hémopathies B[12]. Leur transposition au GBM s'est heurtée à trois obstacles cumulatifs. L'échappement antigénique causé par l'hétérogénéité intratumorale extrême du GBM implique qu'aucun antigène cible n'est uniformément exprimé, et que la pression sélective des CAR-T sélectionne rapidement des clones antigène-négatifs[8]. De plus un autre obstacle en prendre en compte est l'infiltration tumorale qui est limitée. La BHE maintient une imperméabilité relative aux cellules immunitaires dans les zones d'infiltration diffuse, précisément celles où résident les GSC[32]. En somme, même les CAR-T parviennent à infiltrer la tumeur, l'expression de PD-L1, la production de TGF-β et d'IL-10 et l'abondance des Treg suppriment rapidement leur activité cytotoxique[35,38]. Les CAR-NK, offrant une cytotoxicité naturelle complémentaire et une utilisation allogénique sans risque de maladie du greffon, constituent une alternative prometteuse mais se heurtent aux mêmes obstacles[37]. Les stratégies de nouvelle génération restent en développement préclinique ou en phase d'essai précoce[13].

Le panorama de ces échecs dessine en creux les impératifs qu'une stratégie thérapeutique devra satisfaire : cibler l'hétérogénéité intratumorale pour prévenir l'échappement clonal; atteindre les GSC au-delà de la BHE intacte; reprogrammer activement le microenvironnement pour convertir la tumeur froide en tumeur chaude ; induire une réponse immunitaire polyclonale réduisant la pression sélective sur un antigène unique ; et générer une mémoire immunitaire durable contre les rechutes[43].

III.Du cancer ennemi au cancer thérapeutique : émergence d'un nouveau paradigme

3.1. Le paradoxe du cancer comme source thérapeutique

3.1.1. Exploiter la plasticité du glioblastome

La plasticité phénotypique extrême du GBM, sous-tendue par des remaniements épigénétiques dynamiques, implique paradoxalement une permissivité exceptionnelle à la reprogrammation. Dans la lignée des travaux de Takahashi et Yamanaka[54] sur les iPSC, où l'identité cellulaire est envisagée comme un équilibre épigénétique dynamique et non comme un état figé, cette plasticité du GBM peut être redirigée plutôt que combattue. Des cellules tumorales modifiées pour exprimer des molécules immunostimulantes conservent leur phénotype tumoral tout en devenant des vecteurs actifs d'une réponse anti-tumorale, une faisabilité démontrée expérimentalement[55], qui rejoint l'hypothèse de Hanahan selon laquelle les hallmarks du cancer constituent autant de vulnérabilités exploitables[4].

Cette plasticité épigénétique n'est cependant qu'un premier levier parmi trois propriétés biologiques du GB. Le tropisme tumoral, d'abord, confère aux cellules de GBM la capacité de migrer spécifiquement vers leur site d'origine, offrant un mode de ciblage biologique que la chirurgie et la pharmacologie conventionnelle ne peuvent égaler. La diversité antigénique, ensuite, fournit un répertoire immunologique propre à chaque tumeur, capable de soutenir une réponse immunitaire polyclonale sans nécessiter l'identification préalable d'épitopes spécifiques. Combinée à la plasticité épigénétique qui rend cette reprogrammation possible, cette architecture à trois axes ; plasticité, tropisme, antigénicité constitue le socle biologique sur lequel repose l'ensemble de la stratégie ThTC, détaillée dans les sections suivantes.

3.1.2. Les cellules tumorales comme vecteurs thérapeutiques : un ciblage biologique naturel

Cette approche repose sur l'exploitation de deux propriétés intrinsèques des cellules tumorales de GBM : leur capacité de self-homing et leur richesse antigénique.

Le self-homing tumoral médié notamment par l'axe CXCR4/CXCL12, le self-homing confère aux cellules de glioblastome une capacité intrinsèque et documentée à migrer activement vers leur tissu d'origine[19]. Cette propriété, délétère dans le contexte de la progression tumorale naturelle, devient un atout thérapeutique majeur une fois détournée : elle constitue un système de ciblage biologique d'une précision que les approches pharmacologiques conventionnelles peinent à égaler. Des cellules tumorales modifiées, administrées comme vecteurs thérapeutiques, exploitent ce tropisme pour acheminer leurs payloads immunomodulateurs directement

au site tumoral y compris dans les zones que la barrière hémato-encéphalique (BHE) rend inaccessibles à tout agent pharmacologique classique. Il a ainsi été montré que des cellules de GBM modifiées conservaient un tropisme intact vers les masses tumorales résiduelles après résection chirurgicale, y compris dans les régions d'infiltration diffuse précisément celles qui concentrent les cellules souches gliomateuses (GSC) responsables des récidives[17].

Les cellules tumorales portent un répertoire antigénique intrinsèque, néoantigènes, antigènes de différenciation, antigènes de surface des GSC (CD133, SOX2, Nestine)[16,17] , qu'aucun vecteur artificiel ne peut reproduire. Or la charge mutationnelle, et donc l'abondance de néoantigènes[42], est l'un des déterminants majeurs de la réponse aux immunothérapies. L'approche par cellules tumorales entières exploite directement ce principe, sans nécessiter l'identification préalable des épitopes : la réponse T polyclonale ainsi induite réduit la pression sélective exercée sur un antigène unique, limitant l'échappement antigénique[8], mécanisme d'échec central des thérapies en développement[25].

En combinant ces deux caractéristiques, les cellules tumorales modifiées posent le fondement d'une stratégie capable à la fois d'atteindre la tumeur et de déclencher contre elle une réponse immunitaire large.

3.2. Première génération : cellules tumorales atténués, principe des vaccins autologues irradiés

3.2.1. Cellules tumorales irradiées

L'idée d'utiliser les cellules tumorales elles-mêmes comme vecteur vaccinal remonte aux travaux pionniers de William Coley à la fin du XIXe siècle, qui observa des régressions spontanées de sarcomes chez des patients infectés par *Streptococcus pyogenes* et postula l'existence d'une immunité anti-tumorale inductible[56]. Le principe des vaccins autologues irradiés est simple : prélever des cellules tumorales du patient, les inactiver par irradiation gamma (50-200 Gy), ce qui abolit leur prolifération sans altérer leur répertoire antigénique, puis les réadministrer pour déclencher une réponse adaptative[57]. L'irradiation induit des cassures double-brin de l'ADN qui rendent les cellules incompétentes sur le plan réplicatif tout en maintenant l'expression des protéines de surface et la présentation CMH-I, offrant ainsi un substrat antigénique représentatif[58]. Contrairement aux vaccins peptidiques monoépitopiques, cette approche polyspécifique induit une réponse polyclonale limitant l'échappement tumoral. Sur le plan pratique, la fabrication de ces vaccins impliquait une chaîne logistique complexe : résection chirurgicale avec prélèvement tissulaire, dissociation enzymatique, culture cellulaire, puis formulation en préparation injectable, souvent associée à un adjuvant non spécifique (hydroxyde d'aluminium) pour amplifier l'immunogénicité[59].

Les vaccins autologues irradiés ont été évalués dans de nombreuses pathologies cancéreuses au cours des années 1970 à 1990.

3.2.2. Données cliniques

Dans le mélanome, les premiers travaux documentèrent des réponses immunitaires mesurables (hypersensibilité retardée, prolifération lymphocytaire) et quelques réponses cliniques isolées[60], ouvrant la voie à des essais contrôlés plus larges pour en évaluer le bénéfice en survie globale[61]. *(Figure 7)*

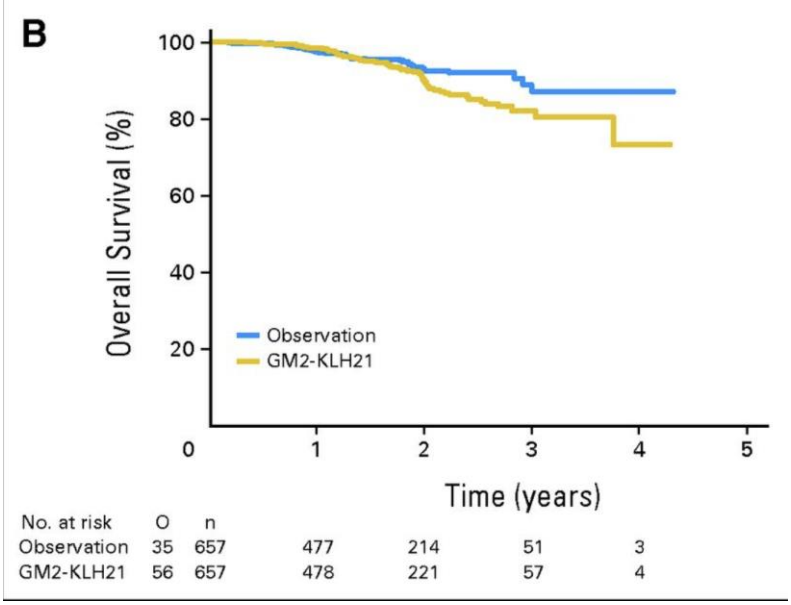


Figure 7bis *: Résultats des essais de vaccination tumorale dans le mélanome, adapté de Eggermont AM. et al. 2013*[61]

Dans le contexte du GBM, les essais pilotes se heurtaient à la quantité limitée de tissu disponible et à la difficulté de culture. Les résultats cliniques initiaux des vaccins tumoraux autologues sont restés modestes lorsqu'ils étaient utilisés seuls, mais des approches combinées, notamment avec la chimiothérapie, ont montré des améliorations significatives de la réponse tumorale[62,63]. *(Figure 8)*

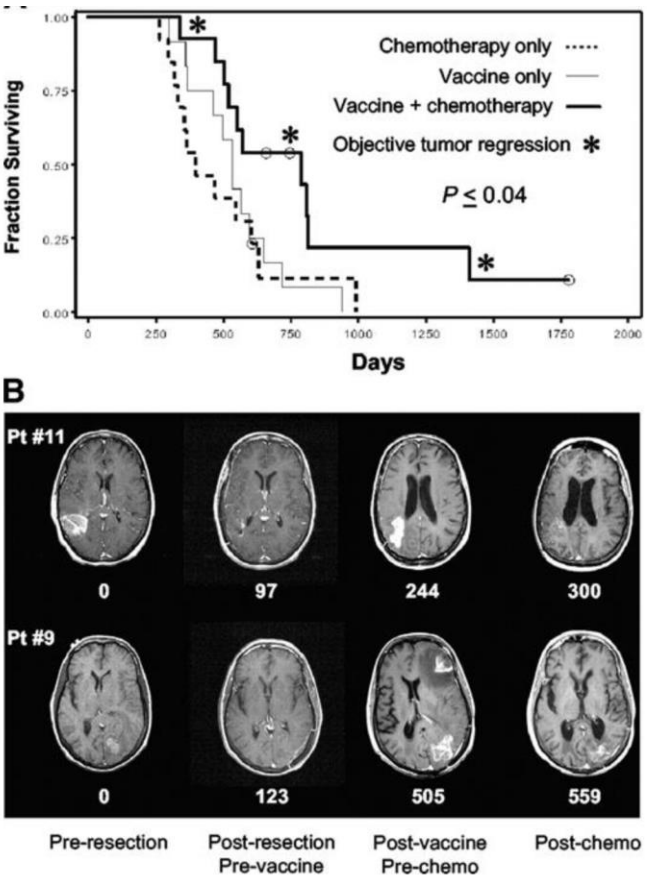


Figure 8bis : *Efficacité des vaccins tumoraux autologues combinés à la chimiothérapie, adapté de Wheeler et al. 2004*[63]

Des essais de phase I et II ont également évalué un vaccin à base de cellules pancréatiques tumorales autologues irradiées combinées au GM-CSF dans le cancer du pancréas[64]. L'immunothérapie vaccinale peut ainsi rendre une tumeur pancréatique immunologiquement visible en induisant une infiltration de lymphocytes T et la formation de structures lymphoïdes intratumorales tout en révélant, en parallèle, l'activation de mécanismes de frein immunitaire qu'il devient nécessaire d'adresser.

Ces essais convergent vers un même constat : un profil de tolérance favorable, qui constitue un argument solide pour la suite du développement, et des pistes claires d'optimisation. Trois axes se dégagent naturellement pour la génération suivante : générer une mort cellulaire immunogène, fournir une co-stimulation active, et remodeler le microenvironnement tumoral. Ce sont précisément ces trois axes qui guideront l'ingénierie de la génération suivante, GVAX.

3.3. Deuxième génération : GVAX et GM-CSF

Dans la continuité de ces premiers résultats, le tournant des années 1990 voit émerger une stratégie d'optimisation : doter les cellules tumorales elles-mêmes de propriétés

immunostimulatrices intrinsèques. Les travaux pionniers de Dranoff et al.[46] démontrent que des cellules tumorales irradiées sécrétant du GM-CSF induisent une immunité anti-tumorale systémique, durable et spécifique. La rationalité est claire : le GM-CSF stimule la maturation des précurseurs myéloïdes en cellules dendritiques et active les macrophages pro-inflammatoires, adressant directement le besoin de co-stimulation identifié dans la génération précédente. Les données expérimentales démontrent que le vaccin B16/GM-CSF augmente significativement le taux de survie par rapport aux groupes témoins, en stimulant une réponse immunitaire protectrice et thérapeutique contre le mélanome[46]. *(Figure 9)*

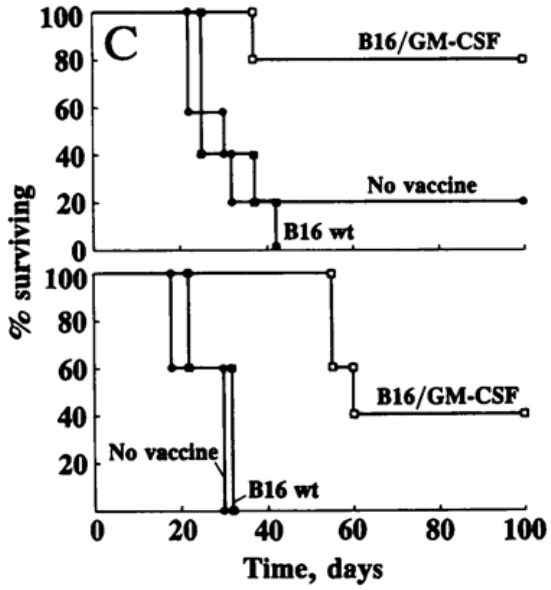


Figure 9 : *Effet protecteur et thérapeutique du vaccin GM-CSF (GVAX) contre le mélanome, adapté de Dranoff G. et al. 1993[46]*

Le bilan clinique, notamment dans le contexte du GBM, a confirmé la faisabilité technique de la production de vaccins à base de cellules tumorales irradiées ± GM-CSF et documenté des réponses immunitaires périphériques mesurables[65], ouvrant la voie à de nouvelles pistes d'optimisation pour renforcer le bénéfice en survie globale.

Cette génération valide trois principes clés pour la suite : l'ingénierie génétique des cellules tumorales est faisable, sûre et biologiquement pertinente ; une stratégie monofonctionnelle reste toutefois limitée face à la multiplicité des mécanismes immunosuppresseurs du GBM ; et la fenêtre sécrétoire, restreinte par l'irradiation des cellules, plaide en faveur du passage à des cellules vivantes et métaboliquement actives[47].

3.4. Troisième génération : « Killer Vaccine »

Les deux premières générations ont posé les bases biologiques et validé la faisabilité de l'approche ; la troisième génération, dite « Killer Vaccine », en tire une conclusion paradigmatique :

la cellule tumorale cesse d'être le substrat passif d'une inactivation pour devenir l'agent actif d'une destruction orchestrée vivante, métaboliquement active, génétiquement reprogrammée pour exercer une cytotoxicité directe, un recrutement immunitaire et un remodelage du TME de manière soutenue et coordonnée.

Un sujet que je tiens à aborder concerne les travaux réalisés au cours du dernier semestre : j'ai souhaité intégrer les enseignements tirés de mon stage, dont les travaux constituent un apport direct à la réflexion développée dans cette thèse.

Le tandem repose ici sur deux molécules aux modes d'action synergiques avec une architecture moléculaire composée d'IFNβ et de GM-CSF.

L'IFNβ est une cytokine pléiotrope à double vocation, cytotoxique et immunostimulatrice, dont les effets anti-tumoraux directs sont documentés depuis plusieurs décennies[44]. Par l'activation de ses voies de signalisation, elle induit une cascade apoptotique, up-regulation des gènes pro-apoptotiques et répression des inhibiteurs de l'apoptose tout en renforçant l'immunogénicité des cellules voisines via une présentation antigénique accrue par le CMH-I[41]. Sécrétée localement par les cellules tumorales elles-mêmes, elle s'affranchit de la barrière hémato-encéphalique : contrairement aux agents systémiques qui ne peuvent l'atteindre depuis la circulation générale, elle agit directement au sein du microenvironnement tumoral (TME)[27]. *(Figure 10)*

Table 1
IFN classification and properties

IFN Type	IFN categories	Receptor type	Prototypic cell of origin	Direct Anti-proliferative effects	Stimulates MHC class I expression	Stimulates MHC class II expression	Stimulates NK cell activation
Type I	Alpha (α)	I	Leukocyte	Yes	Yes	No	Yes
	Beta (β)	I	Fibroblast	Yes	Yes	Slightly	Yes
	Omega (ω)	I	Leukocyte	Yes	Yes	No	Yes
	Tao (τ)	I	Ovine				
			Trophoblast				
Type II	Gamma (γ)	II	T-cells	Yes	Yes	Yes	Less than type I
			NK cells				IFNs, delayed

Figure 10 : *Action locale de l'interféron-β dans le microenvironnement tumoral, adapté de Jonasch E. et al. 2001[44]*

Le GM-CSF, de son côté, orchestre la réponse adaptative locale : recrutement des cellules dendritiques, reprogrammation des macrophages associés à la tumeur (TAM) de M2 vers M, il constitue le facteur de croissance hématopoïétique le plus efficace pour mobiliser et recruter les cellules dendritiques au sein du microenvironnement tumoral[46].

La combinaison IFNβ + GM-CSF n'est pas une simple juxtaposition additive, mais une synergie fonctionnelle : l'IFNβ tue les cellules tumorales et libère un spectre d'antigènes tumoraux qui,

capturés par les cellules dendritiques recrutées par le GM-CSF dans un contexte localement pro-immunogène, initient une réponse T adaptative polyclonale supérieure à ce que chacune des molécules peut induire séparément[45]. L'IFNβ génère le substrat antigénique ; le GM-CSF génère le contexte de présentation. Ensemble, ils opèrent la conversion d'une mort cellulaire tolérogène limite centrale des premières générations en une mort cellulaire immunogène (*Immunogenic Cell Death*, ICD)[49]. *(Figure 11)*

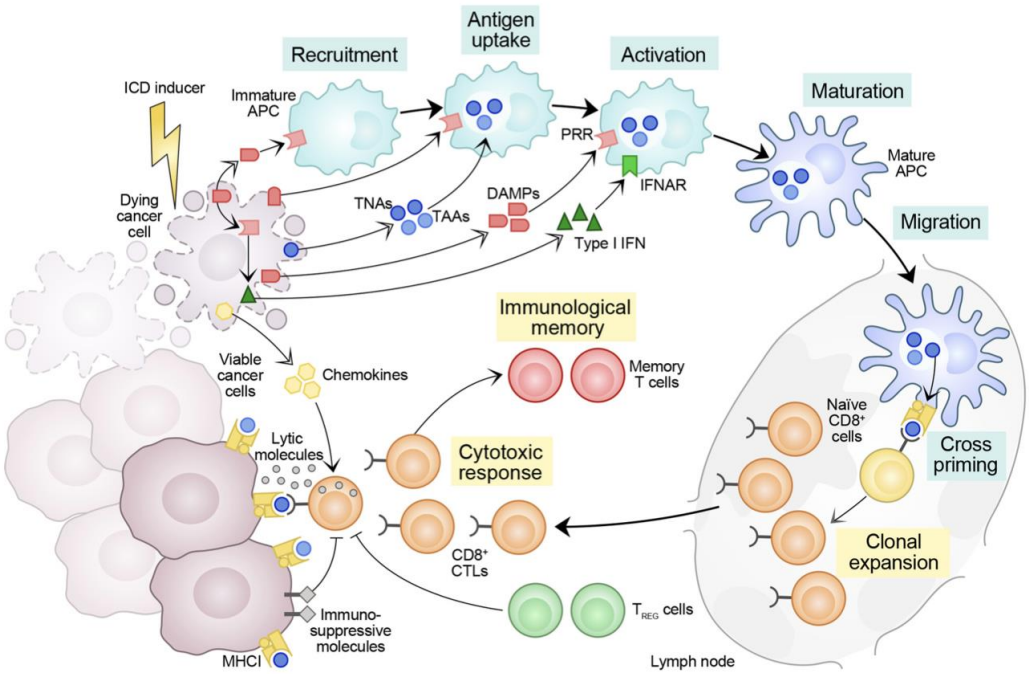


Figure 11 : *Induction de la mort cellulaire immunogène par la combinaison IFN-β/GM-CSF, adapté de Galluzzi L. et al. 2020*[49]

IV. Plateforme proposée : “vaccin off-the-shelf" multifonctionnel

4.1. Hypothèse centrale du travail

4.1.1. Concept des cellules tumorales thérapeutiques

Les cellules tumorales thérapeutiques (ThTC, Therapeutic Tumor Cells) constituent une nouvelle classe de produits de thérapie cellulaire avancée reposant sur un renversement paradigmatique fondamental : plutôt que des chercher à détruire ou à contourner les cellules tumorales, cette approche les transforme en agents thérapeutiques actifs, exploitant leurs propriétés biologiques intrinsèques au service d’une réponse immunitaire anti-tumorale coordonnée*(Figure 12).*
Sur le plan définitionnel, les ThTC sont des cellules tumorales autologues ou allogéniques ayant subi une reprogrammation génétique ciblée par édition génomique (principalement via CRISPR-Cas9 et transduction virale), leur conférant la capacité d’exprimer et de sécréter de manière constitutive ou inductible un ou plusieurs facteurs immunomodulateurs. Ces cellules conservent leurs propriétés phénotypiques tumorales essentielles notamment leur tropisme pour le tissu d’origine (self-homing), leur répertoire antigénique complet et leur capacité d’interaction avec le microenvironnement tumoral, tout en ayant été converties en vecteurs actifs d’une réponse immunitaire adaptative polyclonale et durable.

Le principe général repose sur trois piliers interdépendants :

Pilier 1 : La cytotoxicité directe : Les ThTC sécrétent l'interféron bêta (IFNβ), capables d’induire l’apoptose des cellules tumorales voisines par l’activation des voies JAK-STAT et caspases dépendants, augmentant ainsi la visibilité des cellules tumorales aux lymphocytes T cytotoxiques[44].

Pilier 2 : L’immunostimulation active : Par la sécrétion du GM-CSF *(Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor),* les ThTC induisent le recrutement, la maturation et l’activation des cellules présentatrices d’antigènes (CPA) au sein du microenvironnement tumoral[46].

Pilier 3 : Le remodelage du microenvironnement tumoral : Les ThTC agissent comme agents de conversion du TME immunosuppresseur (tumeur « froide ») en TME immunopermissif (tumeur « chaude »), en contrecarrant les axes immunosuppresseurs dominants par une sécrétion compétitive de signaux pro-inflammatoires, et en induisant la repolarisation des TAM d’un phénotype M2 vers un phénotype M1 pro-cytotoxique[43].

La question de la sécurité biologique est centrale dans toute approche utilisant des cellules tumorales vivantes. Pour répondre à ce défi, l'intégration de système de sécurité aux ThTC permet de garantir un niveau de sécurité compatible avec les exigences réglementaires des produits de thérapie innovantes *(*ATMP, *Advanced Therapy Medicinal Products : Médicaments de Thérapie innovantes)* selon la directive européenne 2001/83/CE et le règlement (CE) n°1394/2007. Ceci sera détaillé au chapitre 6.

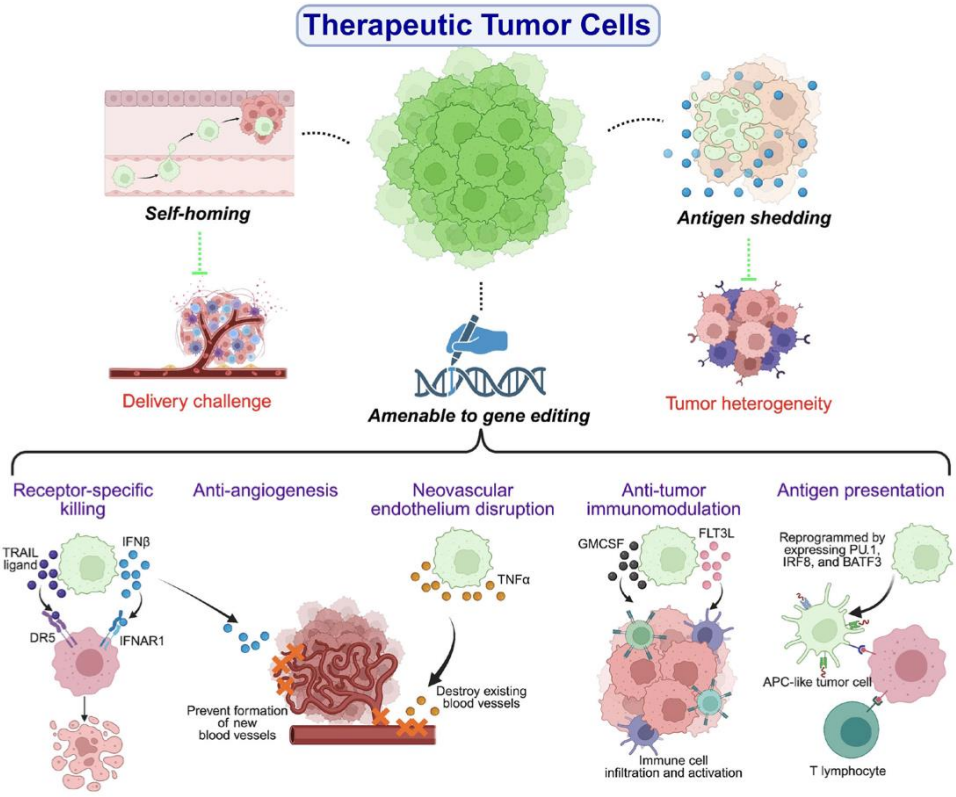


Figure 12 : *Systèmes de sécurité intégrés à la plateforme ThTC, adapté de Chen KS. et al. 2026*[45]

4.1.2. Design des ThTC bifonctionnelles

Les lignées tumorales thérapeutiques (ThTC) ont été générées à partir de glioblastome humain (GBM) maintenues en culture, à 37°C sous atmosphère humidifiée à 5 % de CO_2.
Comme présenté précédemment, les ThTC sont chargés de GM-CSF et IFNβ. Afin de prévenir la toxicité autocrine de l'IFNβ, sécrétée par les ThTC, le gène IFNAR1 a été invalidée par édition génomique CRISPR-Cas9. Pourquoi ? Ici cela sert à supprimer la capacité des cellules tumorales modifiées à répondre à l'IFN-β qu'elles produisent elles-mêmes[55]. Normalement, l'IFN-β se fixe sur IFNAR1/2 et active la voie JAK-STAT, ce qui induit une réponse antivirale mais aussi une inhibition de prolifération voire une apoptose. Dans ce modèle, si les cellules gardent IFNAR1, elles s'auto-inhibent et peuvent mourir à cause de leur propre IFN-β (toxicité autocrine). En supprimant IFNAR1, elles deviennent résistantes à cet effet, ce qui leur permet de survivre et de continuer à sécréter l'IFN-β pour exercer un effet cytotoxique sur les cellules

tumorales voisines. De plus, des vecteurs viraux à l'instar de lentivirus de troisième génération ont été produits par transduction transitoire de cellules HEK293T utilisant des plasmides d'encapsulation afin de transduire les cellules dans les vecteurs lentiviraux. En conséquence, les cassettes d'expression codant pour les trois transgènes thérapeutiques IFNβ sécrétable humain, GM-CSF humain et thymidine kinase du virus Herpès Simplex (HSV-TK, kills switch de sécurité) qu'on détaillera plus tard ont été clonées dans des vecteurs lentiviraux de transfert à architecture modulaire[55]. *(Figure 13)*

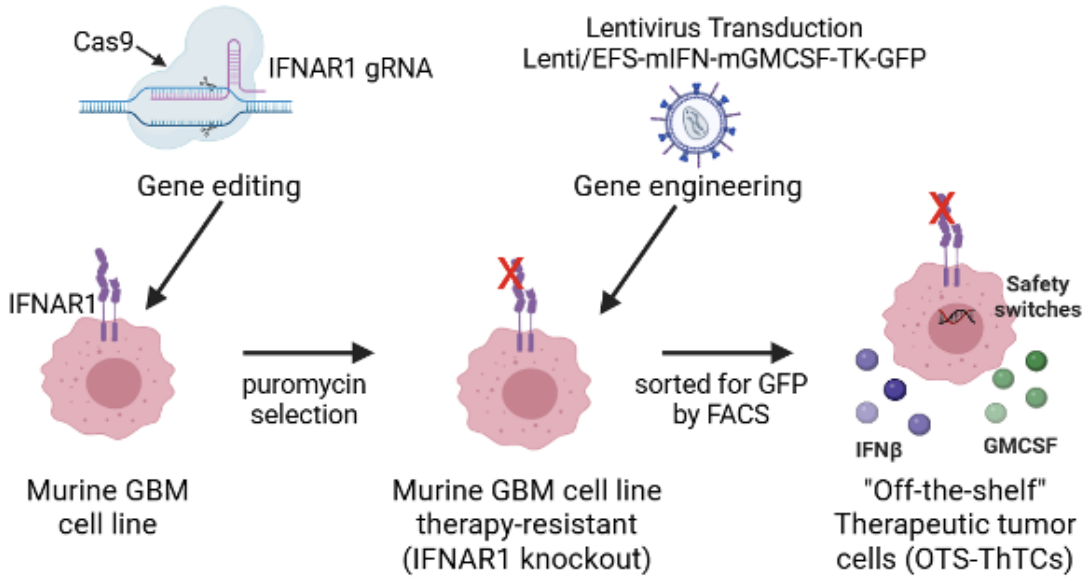


Figure 13 : *Schéma de la construction bifonctionnelle des ThTC*

Cette approche a été publiée dans *Science Translational Medicine* en 2023 par Chen et al[55], et testée dans des modèles murins de glioblastome. Les ThTCs ont éliminé des glioblastomes établis en induisant l'apoptose (mort cellulaire) des cellules cancéreuses. Le traitement a généré une mémoire immunitaire, empêchant la réapparition de tumeurs lors d'une nouvelle exposition au cancer. L'approche a fonctionné non seulement pour le glioblastome, mais aussi pour des modèles de cancer du poumon et de mélanome, y compris contre les métastases. Les ThTC induisent une éradication complète, confirmée par histologie et IRM. *(Figure 14)*

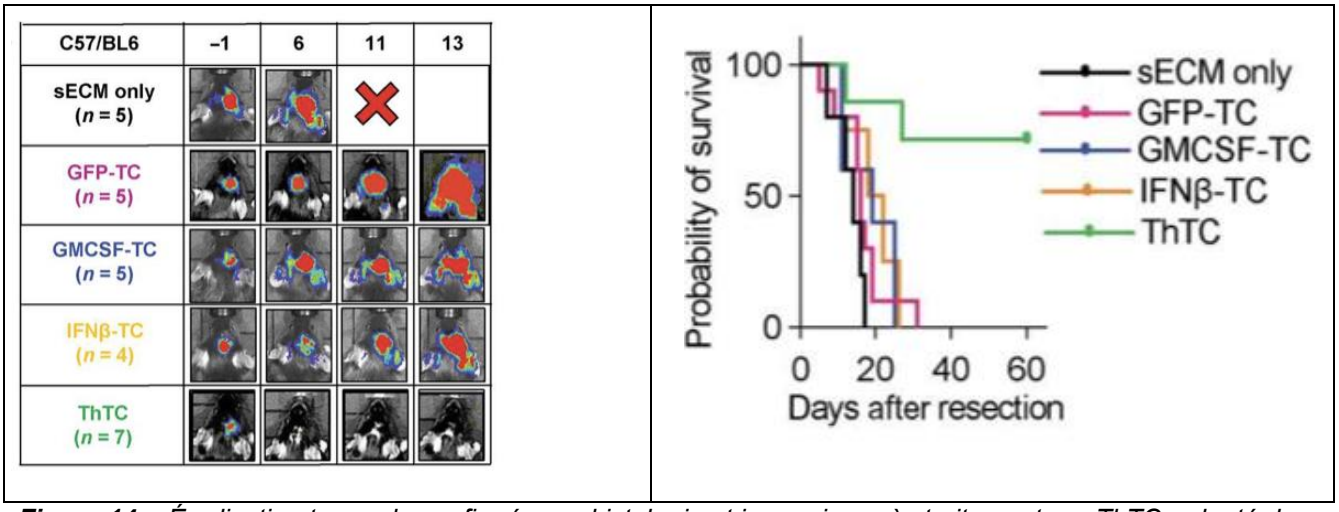


Figure 14 : *Éradication tumorale confirmée par histologie et imagerie après traitement par ThTC, adapté de Chen KS. et al. 2023*[55]

Les ThTC ne constituent pas un remplacement des stratégies thérapeutiques existantes, mais une plateforme complémentaire conçue pour adresser précisément les lacunes biologiques que ces stratégies n'ont pas réussi à combler. Le protocole de Stupp demeure le standard de soins malgré une médiane de survie globale de 14,6 mois[20]. Les principaux mécanismes d'échec résidant dans la résistance des GSC au TMZ[21] et dans l'incapacité à atteindre les cellules tumorales[19]. Les ThTC, administrées en adjuvant post-résection, exploitent précisément le self-homing pour cibler ces foyers résiduels inaccessibles aux agents conventionnels.

L'objectif thérapeutique ultime de la plateforme ThTC est de s'imposer comme l'intervention systématique immédiatement consécutive à la résection chirurgicale, administrée dans la cavité opératoire avant même la fermeture, devenant ainsi le premier traitement adjuvant universel du GBM. En exploitant le tropisme naturel des cellules tumorales vers les foyers résiduels d'infiltration diffuse, les ThTC agiraient là où la chirurgie ni la radiothérapie ne peuvent atteindre sans risque neurologique inacceptable, transformant la cavité de résection d'un espace vide en un microenvironnement immunologiquement actif, capable d'initier d'une réponse anti-tumorale durable avant même que les cellules résiduelles responsables de la récidive n'aient eu le temps de se consolider[53].

4.2. Vers un vaccin universel allogénique

4.2.1. Concept « off-the-shelf »

L'ensemble des approches de vaccination cellulaire décrites dans les chapitres précédents repose sur un postulat logistique fondamental : les cellules thérapeutiques doivent être dérivées du patient lui-même, à partir de tissus, cellules tumorales prélevé lors de la résection chirurgicale. Cette approche autologue possède une rationalité immunologique immédiate, en

garantissant une correspondance parfaite entre le répertoire antigénique du vaccin et celui de la tumeur traitée, tout en évitant tout risque de rejet immunologique lié à l'histo-incompatibilité. Pourtant, l'expérience clinique accumulée au cours de deux décennies d'essais a progressivement révélé que ce modèle autologue constitue, en pratique, l'un des obstacles les plus redoutables au déploiement clinique à grande échelle des vaccins cellulaires dans le glioblastome[47].

Le premier est quantitatif : la résection du GBM ne fournit jamais suffisamment de tissu pour satisfaire simultanément aux besoins diagnostiques, de recherche et de fabrication vaccinale. D'après la FDA, cela se traduit par des échecs de fabrication significatifs et des délais incompatibles avec la fenêtre thérapeutique post-chirurgicale, expliquant les limitations observées en clinique. Cela engendre et condamne à ce que le patient ne reçoit jamais son traitement.

Le deuxième qualitatif : la variabilité inter-patient dans la composition tumorale, la viabilité des cultures et l'efficacité de transduction génère une hétérogénéité du produit final incompatible avec les exigences réglementaires des ATMP. Deux patients recevant nominalement le même « traitement » reçoivent en réalité des produits biologiquement très différents[47].

Le troisième est économique : le coût de fabrication par patient est structurellement élevé et non scalable, rendant l'accessibilité globale impossible particulièrement dans les pays à ressources limitées où la charge du GBM est croissante[2].

Ces trois contraintes imposent le passage vers un modèle allogénique off-the-shelf fabriqué en masse à partir de lignées standardisées, cryopréservé et distribué comme tout médicament biologique conventionnel représentant non pas un simple ajustement logistique, mais un véritable changement de paradigme industriel, réglementaire et immunologique.

La principale objection suscitée par l'abandon du modèle autologue est immunologique : des ThTC non appariées en CMH ne seraient-elles pas rejetées avant d'exercer leur activité thérapeutique ? Trois arguments et suppositions convergents nuancent cette crainte biologiquement fondée dans le contexte de la transplantation d'organes qui diffère de celle de l'administration intracrânienne de ThTC.

Premièrement, le TME profondément immunosuppresseur du GBM, les lymphocytes T infiltrant la tumeur présentent des signatures d'épuisement sévère avec surexpression PD-1, TIM-3, LAG-3, TAM M2 sécrétant massivement IL-10 et TGF-β[33,35] atténuent considérablement la réactivité allogénique locale. L'immunosuppression qui constitue l'obstacle principal aux immunothérapies conventionnelles devient ici un avantage contextuel, prolongeant la persistance des ThTC dans la cavité tumorale.

Deuxièmement, la reconnaissance allogénique elle-même peut être retournée en signal immunostimulateur. Les antigènes CMH allogéniques activent une population de lymphocytes T alloréactifs 100 à 10 000 fois plus fréquente que les lymphocytes T spécifiques d'un antigène tumoral nominal, créant un contexte local d'inflammation et de co-stimulation qui potentialise la présentation des antigènes tumoraux par les DC recrutées par le GM-CSF, ce qu'on appelle l'effet adjuvant allogénique[50].

Troisièmement, les ThTC n'ont besoin de persister que quelques jours à deux semaines, le temps d'initier la cascade immunologique. Une fois la réponse T adaptative polyclonale engagée, elle possède sa propre dynamique autonome et ne dépend plus de la présence continue des ThTC[45].

4.2.2. Avantages d'une thérapie allogénique

Une stratégie multiclonale est privilégiée : le mélange de plusieurs lignées aux profils antigéniques complémentaires élargit la couverture du répertoire tumoral et réduit le risque d'échappement antigénique global, avec une efficacité supérieure à chaque lignée prise isolément démontrée en préclinique[47].

Comment construire l'architecture industrielle aux conditions GMP, de passer de la banque cellulaire au lit du patient ? La faisabilité industrielle du modèle allogénique off-the-shelf repose sur la mise en place d'un processus de fabrication standardisé, reproductible et scalable, organisé selon une logique de production en lots validés adaptée aux exigences des ATMP. Ce processus se décompose en plusieurs étapes critiques dont la maîtrise conditionne la qualité, la sécurité et la disponibilité du produit final. Le processus reposera sur une banque de cellules produits en bioréacteurs fermés, sera cryopréservé à -196°C. *(Figure 16)*

Critère	**Modèle autologue**	**Modèle allogénique (off-the-shef)**
Disponibilité du produit	Différée (4-8 semaines)	Immédiate (<24h)
Taux de succès de fabrication	55-70%	>95%
Standardisation lot-à-lot	Faible	Elevée
Couverture antigénique	Maximale(patient-spécifique)	Partielle
Risque de rejet	Absent	Présent
Coût de production	Elevée, non scalable	Réduit, non scalable
Accessibilité globale	Limitée	Potentiellement universelle
Faisabilité réglementaire	Complexe (lot unique)	Standard biologiques (lots validés)

Figure 16 : *Tableau. Comparaison des modèles autologue et allogénique pour le développement des ThTC dans le GBM*[47]

Au-delà de l'éradication tumorale aiguë, le quatrième pilier de la plateforme ThTC est l'induction d'une mémoire immunitaire anti-tumorale durable[45,55], capable de reconnaître et d'éliminer les cellules tumorales résiduelles lors de leur réémergence, sans requérir de traitement additionnel. La nature polyclonale de cette mémoire ciblant simultanément de multiples antigènes tumoraux la rend structurellement résistante à l'échappement antigénique clonal, sa robustesse collective étant considérablement supérieure à celle d'un clone mémoire unique induit par un vaccin mono-antigénique. Dans les modèles murins, cette mémoire a abouti à une protection complète au rechallenge tumoral, sans traitement additionnel. *(Figure 17)*

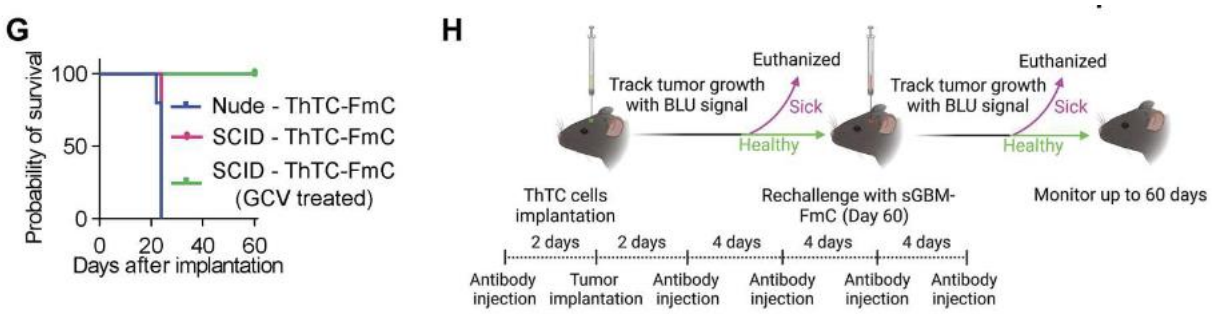


Figure 17 : *Mémoire immunitaire anti-tumorale et protection au rechallenge, adapté de Chen KS. et al. 2023*[55]

Si une fraction même minoritaire de patients atteints de GBM développait une telle immunité protectrice durable, l'impact clinique serait considérable dans une pathologie où la récidive quasi-universelle constitue la principale cause de mortalité et où aucun traitement n'a jamais démontré la capacité d'induire une surveillance immunitaire à long terme[22].

Il est important de retenir que la cascade thérapeutique énoncée ne s'additionnent pas mais s'enchaînent causalement. La cytotoxicité directe génère le substrat antigénique[49], le remodelage du TME élimine les obstacles à la présentation en repolarisant les TAM M2 vers M1. L'immunostimulation active convertit ce substrat en réponse T adaptative polyclonale via le recrutement de DC matures par le GM-CSF[36,46]. La mémoire immunitaire pérennise cette réponse au-delà de la durée de vie des ThTC elles-mêmes[45].
C'est cette coordination spatiale et temporelle réalisable uniquement par une cellule vivante multifonctionnelle qui constitue l'avantage irréductible des ThTC sur toute combinaison d'agents distincts cherchant à reproduire séquentiellement les mêmes étapes[43], et qui justifie leur ambition de devenir la thérapie adjuvante universelle immédiatement consécutive à la résection chirurgicale dans le GBM.

IV.Validation préclinique

5.1. Modèles expérimentaux utilisés

5.1.1. Lignées cellulaires

Afin d'évaluer de manière rigoureuse et transposable l'efficacité des ThTC *in vitro*, ce projet combine des modèles murins syngéniques et des lignées humaines de glioblastome, permettant de capturer à la fois la complexité immunologique *in vivo* et la pertinence translationnelle pour la pathologie humaine.

Le tableau 18 répertorie les lignées cellulaires utilisées pour ce projet. Les cultures ont été maintenues à 37°C avec 5 % de CO_2 et 80 % d'humidité. Les lignées cellulaires ont été testées pour la mycoplasmose. Les cellules adhérentes ont été cultivées dans un milieu DMEM (Dumbecco's Modified Eagle Medium à haute teneur en glucose) supplémenté avec 10 % de sérum foetal bovin et 1 % de penicilline/streptomycine. Les cellules ont subi un passage à 80-90 % de confluence et détachées à l'aide de trypsine-EDTA 0,05 %. Pour les cellules flottantes, elles ont été cultivées dans un milieu Neurobasal (NB), spécialement adapté aux cellules neuronales et aux cultures en condition non adhérente.
Ce milieu est complété par des facteurs de croissance essentiels tels que le EGF : 100ug/mL (Epidermal Growth Factor) et le FGF : 100ug/mL (Fibroblast Growth Factor).

Pour finir, l'étape d'après était d'utiliser des lignées de GBM humains primaires dérivées directement de patients, afin de représenter la diversité biologique du GBM. *(Figure 18)*

Lignées cellulaires				
Nom	Origine	Medium	Croissance	Caractéristiques
Lignées GBM murines, cellules thérapeutiques				
SMA 560	derived from VM/DK mice	DMEM	Adhérente	Expression de TGF-β / GM-CSF
4C8	derived from B6D2F1 mice	DMEM	Adhérente	Expression de TGF-β / GM-CSF
C3	derived from VM/DK mice	DMEM	Flottante	Expression de TGF-β /

				GM-CSF
Lignées GBM murines, cibles thérapeutiques				
CT2A	derived from C57BL6 mice	DMEM	Adhérente	Astrocytome murin extrêmement agressif et immunosuppresseur
GL261	derived from C57BL6 mice	DMEM	Adhérente	Les cellules d'astrocytome sont plus immunogènes que les cellules CT2A
Cellules utilisées pour transduction				
293T	American Center for the Collection of Typical Cultures (ATCC)	DMEM	Adhérente	Cellules embryonnaires rénales humaines

Figure 18 : *Tableau caractérisant les différentes lignées cellulaires*

5.1.2. Panorama des modèles murins disponibles pour l'évaluation des ThTC

L'évaluation préclinique d'une plateforme de thérapie cellulaire comme les ThTC impose des exigences particulières sur le choix des modèles. Les agents cytotoxiques conventionnels peuvent être testés en xénogreffe, c'est-à-dire par implantation de cellules d'une espèce différente (ici humaines) chez des souris immunodéficientes dépourvues de système immunitaire fonctionnel. Ce modèle est en revanche inadapté aux ThTC, dont l'effet thérapeutique repose principalement sur des mécanismes immunitaires adaptatifs[45] : sans système immunitaire fonctionnel, ni la cytotoxicité croisée IFNβ-dépendante, ni le recrutement des cellules dendritiques (DC) par le GM-CSF, ni la réponse T polyclonale ou la mémoire immunitaire ne peuvent être évalués. Un tel modèle surestimerait l'efficacité en ne mesurant qu'une cytotoxicité directe isolée, sans refléter la réalité immunologique de la maladie humaine. Un second impératif est la représentativité du microenvironnement tumoral notamment la présence de macrophages associés aux tumeurs de polarisation M2 (TAM M2, à profil pro-tumoral et immunosuppresseur), de lymphocytes infiltrants en état d'épuisement fonctionnel (TIL épuisés), d'une vascularisation aberrante et d'un profil immunosuppresseur global[33] nécessaire pour évaluer le remodelage opéré par les ThTC. Trois grandes familles de modèles murins permettent de répondre, à des degrés divers, à ces deux exigences.

Les modèles syngéniques murins immunocompétents orthotopiques reposent sur l'implantation de cellules tumorales murines directement au site anatomique naturel de la tumeur (intracrânien), pour reproduire la localisation du GBM chez des souris immunocompétentes. Le terme « syngénique » signifie que les cellules tumorales et l'hôte murin partagent le même fond

génétique, ce qui exclut tout rejet lié à une incompatibilité immunologique et permet donc d'étudier une tumeur en présence d'un système immunitaire complet et fonctionnel. Ce modèle est le seul des trois à permettre l'évaluation intégrale des mécanismes immunitaires visés par les ThTC : cytotoxicité IFNβ-dépendante, activation des DC via le GM-CSF, réponse T polyclonale et constitution d'une mémoire immunitaire. Il reproduit également fidèlement le microenvironnement tumoral immunosuppresseur (TAM M2, TIL épuisés). Sa limite principale tient aux différences inter-espèces : les lignées tumorales murines utilisées ne recapitulent pas totalement la biologie moléculaire du GBM humain.

Les modèles xénogreffiques en souris immunodéficientes (NOD-SCID) consistent à implanter des lignées tumorales humaines établies (U87, LN229) chez des souris dépourvues d'immunité adaptative fonctionnelle. Leur intérêt n'est pas d'évaluer les mécanismes immunitaires impossibles à étudier en l'absence de système immunitaire mais de caractériser des paramètres directement transposables à la clinique pour la définition des doses : la cinétique du self-homing (capacité des cellules thérapeutiques à migrer spécifiquement vers le site tumoral), la persistance cellulaire in vivo, et l'activité cytotoxique directe des ThTC sur des cellules tumorales humaines. Ce modèle offre donc un cadre simple, robuste et directement pertinent pour l'étude des cellules humaines, mais expose à une surestimation de l'efficacité thérapeutique globale s'il est interprété isolément, faute de composante immunitaire.

Les modèles humanisés (souris NSG reconstituées par greffe de cellules souches hématopoïétiques CD34+ ou par transfert de cellules mononucléées du sang périphérique humain, PBMC) offrent le niveau de complexité le plus élevé pour l'étude des ThTC. Les souris NSG (NOD scid gamma), plus sévèrement immunodéficientes que les NOD-SCID, permettent l'implantation d'un système immunitaire humain fonctionnel après reconstitution, ce qui autorise l'évaluation des interactions immunologiques des ThTC dans un contexte pleinement humain[47]. Ils constituent à ce titre une étape clé de confirmation avant les essais de phase I, en permettant de valider la reproductibilité des résultats obtenus dans les modèles syngéniques murins. Leurs limites restent cependant significatives : la reconstitution immunitaire demeure incomplète (certaines populations, notamment myéloïdes, sont sous-représentées), il existe un risque de réaction du greffon contre l'hôte (GVH, réponse immunitaire des cellules greffées contre les tissus de la souris receveuse), et leur coût ainsi que leur complexité technique en limitent l'usage à des étapes ciblées du développement préclinique. *(Figure 19)*

Type de modèle	**Caractéristiques**	**Avantages**	**Limites**	Apport pour les ThTC
Modèles syngéniques murins immunocompétents (orthotopiques)	Cellules tumorales murines implantées intracrâniennement chez des souris immunocompétentes	- Système immunitaire fonctionnel complet - Reproduction du TME immunosuppresseur (TAM M2, TIL épuisés)	- Différences inter-espèces - Biologie tumorale non totalement superposable à	- Évaluation des mécanismes immunitaires : • Cytotoxicité IFNβ-dépendante

		- Modèles reproductibles	l'humain	• Activation des DC (GM-CSF) • Réponse T polyclonale • Mémoire immunitaire
Modèles xénogreffes (souris immunodéficientes type NOD-SCID)	Implantation de cellules humaines (U87, LN229) sans système immunitaire fonctionnel	- Utilisation de cellules humaines - Étude directe des cellules tumorales humaines - Modèles simples et robustes	- Absence d'immunité adaptative - Non pertinents pour les mécanismes immunitaires - Surestimation possible de l'efficacité	- Étude de paramètres transposables : • Self-homing des ThTC • Persistance in vivo • Cytotoxicité directe
Modèles humanisés (NSG + CD34+ ou PBMC)	Souris immunodéficientes reconstituées avec un système immunitaire humain	- Contexte immunitaire humain - Évaluation des interactions immunes complexes - Haute pertinence translationnelle	-Reconstruction immunitaire incomplète - Risque de GVH - Coût élevé - Complexité technique	- Validation des mécanismes immunitaires humains - Confirmation des résultats murins - Étape clé avant essais cliniques

Figure 19 : *Comparaison des modèles précliniques pour l'évaluation des ThTC dans le GBM*

5.2. Etudes in vitro

5.2.1. Cytotoxicité croisée des ThTC versus cellules tumorales

La démonstration de la cytotoxicité croisée IFNβ-dépendante constitue le premier niveau de preuve de concept *in vitro* de la plateforme ThTC. Le protocole expérimental de référence repose sur des expériences de co-culture, dans lesquelles les ThTC sont placées dans le compartiment supérieur, séparées des cellules tumorales non modifiées dans le compartiment inférieur. Cette configuration permet d'évaluer spécifiquement la cytotoxicité médiée par les facteurs solubles sécrétés par les ThTC, indépendamment de tout contact cellulaire direct.

La viabilité des cellules tumorales cibles est quantifiée à 5 jours par luminescence (D-Luciferin). Les résultats attendus documentent une réduction dose-dépendante de la viabilité des cellules tumorales non modifiées en fonction du ratio ThTC/cellules cibles, sans réduction de viabilité dans les groupes contrôles (cellules tumorales non modifiées en co-culture avec des ThTC IFNAR1-KO n'exprimant pas IFNβ, ou cellules tumorales IFNAR1-KO insensibles à l'IFNβ sécrété). Ces contrôles orthogonaux permettent d'attribuer formellement la cytotoxicité observée à l'axe IFNβ/IFNAR1 et non à des effets non spécifiques de la co-culture. La résistance des ThTC à leur propre payload est validée en parallèle par exposition des ThTC IFNAR1-KO à des concentrations croissantes d'IFNβ recombinant exogène, démontrant

l'absence de réduction de viabilité par rapport aux cellules parentales exprimant IFNAR1, validation fonctionnelle directe de l'efficacité du KO [45].

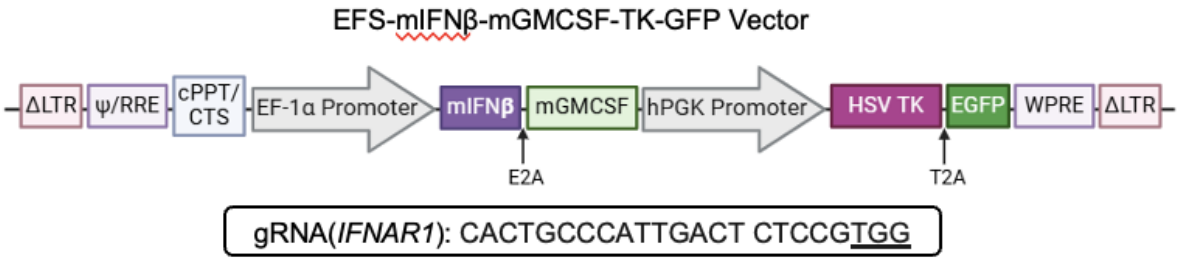


Figure 20 : *Construction du plasmide*

Tout d'abord, nous avons désigné la séquence via clonage et toutes les étapes nécessaires de création de plasmide. Le schéma détaille la carte du vecteur lentiviral EFS-mIFNβ-mGMCSF-TK-GFP. De 5' en 3', la construction comporte les séquences ΔLTR, ψ/RRE et cPPT/CTS, un promoteur EF-1α pilotant l'expression conjointe de mIFNβ et de mGMCSF (reliés par un peptide auto-clivant E2A), puis un promoteur hPGK commandant la thymidine kinase HSV (HSV-TK) et l'EGFP (reliés par un peptide T2A), suivis des éléments WPRE et ΔLTR. La séquence de l'ARN guide ciblant IFNAR1 est également indiquée.

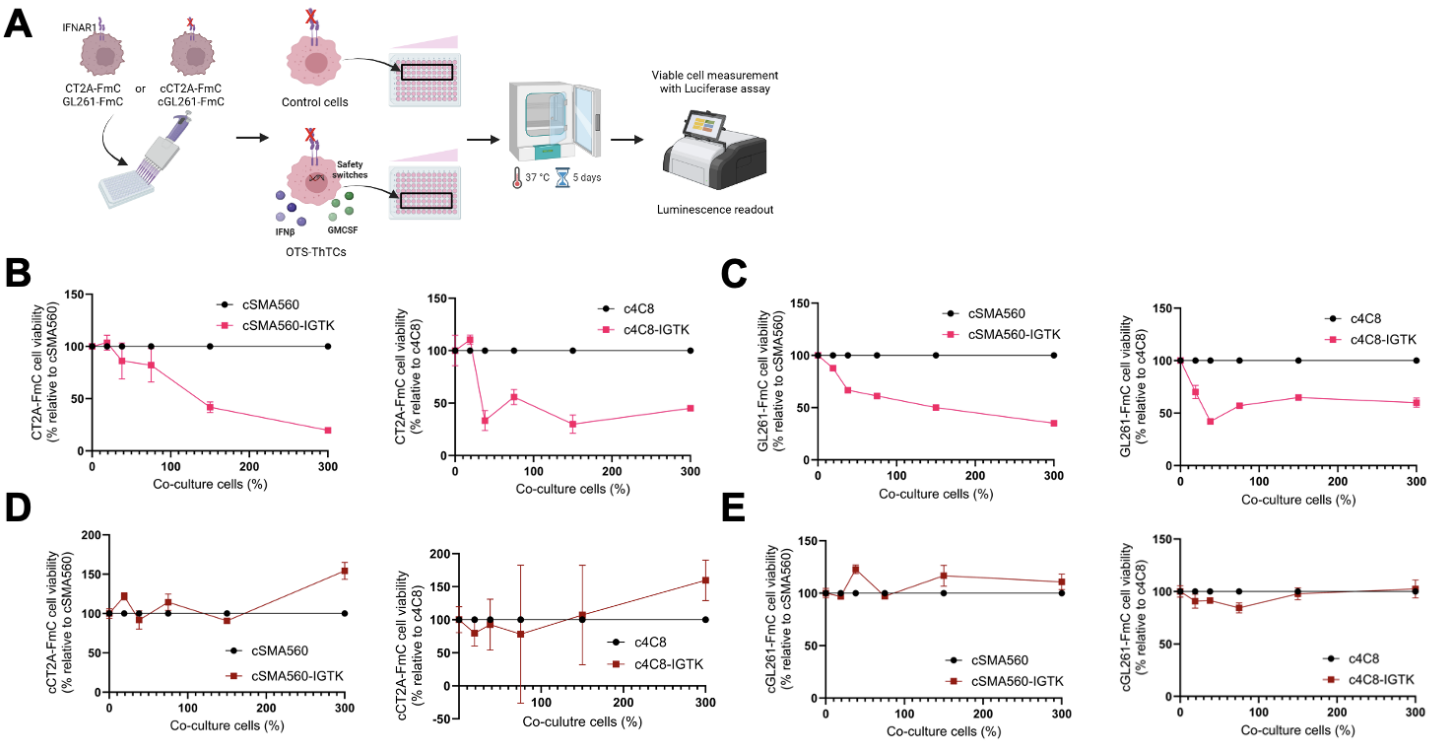


Figure 21 : *Les OTS-ThTCs éliminent différents sous-types de lignées cellulaires murines de glioblastome (GBM) in vitro via la voie de signalisation de l'IFN-β.**(A)** Schéma expérimental des études de cytotoxicité.**(B)** Co-culture des OTS-ThTCs avec les cellules CT2A-FmC.**(C)** Co-culture des OTS-ThTCs avec les cellules GL261-FmC.**(D)** Co-culture des OTS-ThTCs avec les cellules cCT2A-FmC (knockout d'IFNAR1). **(E)** Co-culture des OTS-ThTCs avec les cellules cGL261-FmC (knockout d'IFNAR1). Les données sont exprimées en moyenne ±*

écart-type (SD) de n = 3 expériences indépendantes réalisées en3 réplicats. Les analyses statistiques ont été réalisées par une ANOVA à un facteur (one-way ANOVA).

Ces expériences visent à déterminer si les OTS-ThTC exercent un effet cytotoxique direct sur différents sous-types de lignées murines de GBM in vitro, et si cet effet dépend de la voie de l'IFN-β. Les cellules cibles CT2A-FmC et GL261-FmC, lignées murines de GBM exprimant la construction rapporteure Fluc-mCherr ont été co-cultivées pendant 5 jours à 37 °C avec des OTS-ThTC (cSMA560-IGTK, c4C8-IGTK) ou avec les cellules effectrices contrôles correspondantes non modifiées (cSMA560, c4C8), la durée de 5 jours correspondant au délai estimé nécessaire à l'IFN-β pour exercer son effet cytotoxique. La viabilité a été mesurée par dosage luminescent de la luciférase *(Fig. 21B, C).* Les co-cultures avec les OTS-ThTC ont montré une diminution dose-dépendante marquée et reproductible de la viabilité des cellules cibles CT2A-FmC et GL261-FmC, alors que les conditions contrôles sont restées proches de 100 % de viabilité.

Afin de vérifier que cet effet cytotoxique passe spécifiquement par la voie IFN-β/IFNAR1, la même expérience a été réalisée avec des lignées cibles cCT2A-FmC et cGL261-FmC, c'est-à-dire les lignées CT2A-FmC et GL261-FmC rendues déficientes pour le récepteur **I**FNAR1 par invalidation génique (knock-out). En l'absence de ce récepteur, aucune diminution de viabilité n'a été observée, quelle que soit la proportion de cellules effectrices en co-culture *(Fig. 21D, E).* Ce résultat confirme que la cytotoxicité directe des OTS-ThTC in vitro repose sur la liaison de l'IFN-β à son récepteur IFNAR1, qui induit l'apoptose des cellules cibles qui l'expriment.

Il est à noter que ces résultats tendent probablement à sous-estimer l'effet cytotoxique réel des OTS-ThTC : les cellules effectrices contrôles (cSMA560, c4C8) prolifèrent plus rapidement in vitro que leurs homologues transduites (cSMA560-IGTK, c4C8-IGTK), qui portent une étape d'ingénierie génétique supplémentaire. Dans un puits à espace limité, cette différence de cinétique de croissance favorise une occupation plus importante de l'espace disponible par les cellules contrôles au détriment des cellules tumorales cibles, alors que les OTS-ThTC, à croissance plus lente, laissent davantage d'espace disponible aux cellules tumorales, ce qui pourrait masquer une partie de l'effet cytotoxique réel.

5.2.2. Validation de l'expression et de la sécrétion d'IFNβ et de GM-CSF

La caractérisation quantitative et qualitative de l'expression transgénique constitue un prérequis indispensable à toute évaluation d'efficacité, et un attribut critique de qualité (CQA) dans la perspective du développement pharmaceutique. Le niveau de sécrétion d'IFNβ et de GM-CSF par les ThTC est quantifié par ELISA et Western Blot de haute sensibilité sur surnageants de culture collectés.

La quantification de l'IFNβ et du GM-CSF sécrétés repose sur des ELISA sandwich quantitatifs de spécificité espèce adaptée au système cellulaire utilisé (kits humains pour les ThTC dérivées de lignées humaines, kits murins pour les études de preuve de concept en modèle syngénique).

Le format sandwich utilise un anticorps de capture immobilisé sur plaque 96 puits, une incubation séquentielle du surnageant à tester puis d'un anticorps de détection biotinylé ou couplé HRP, et une révélation colorimétrique (TMB) ou chimiluminescence selon la sensibilité requise.

Chaque échantillon de surnageant est testé en triplicat technique, à au moins deux dilutions encadrant la zone linéaire de la courbe standard, sur des plaques indépendantes pour permettre le calcul des coefficients de variation intra-essai (répétabilité) et inter-essai (reproductibilité).

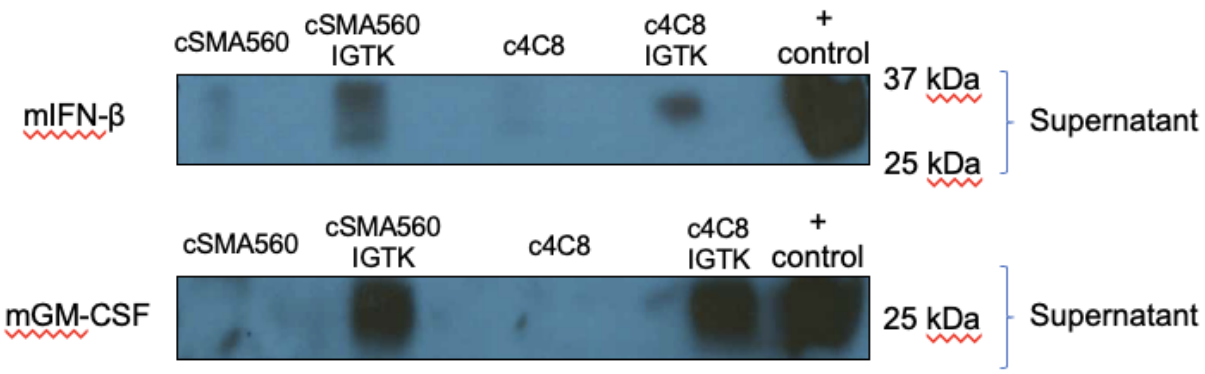


Figure 22 : *Analyse par Western blot de l'expression de l'IFN-β murin (mIFN-β) et du GM-CSF murin (mGM-CSF) dans les OTS-ThTCs et les cellules contrôles*

L'immunodétection par western blot dans le surnageant de culture est présentée pour les lignées cSMA560, cSMA560-IGTK, c4C8 et c4C8-IGTK soit les mêmes lignées productrices d'OTS-ThTC (et leurs contrôles parentaux non modifiés) que celles utilisées dans les essais de cytotoxicité croisée présentés précédemment, ce qui permet d'établir un lien direct entre la sécrétion effective des transgènes et l'effet cytotoxique fonctionnel observé avec un contrôle positif. Des bandes correspondant à l'IFNβ murin (entre environ 25 et 37 kDa) et au GM-CSF murin (environ 25 kDa) sont détectées dans les surnageants des lignées modifiées (« -IGTK ») ainsi que dans le contrôle positif, alors qu'elles sont absentes ou très faibles pour les lignées parentales non modifiées, confirmant la sécrétion effective des deux cytokines par les cellules thérapeutiques.

5.2.3. Évaluation du système de sécurité par ganciclovir

La validation in vitro des kill switches intégrés dans les ThTC constitue un impératif de sécurité non négociable, directement conditionnel à toute progression vers les études in vivo et les essais cliniques. Chaque système de sécurité est validé indépendamment dans des conditions de dose-réponse rigoureuses.

Pour le système HSV-TK/ganciclovir, les ThTC exprimant la thymidine kinase du virus Herpes Simplex sont exposées à des concentrations croissantes de ganciclovir (GCV, 0,1 à 100 µM) pendant 48 à 72 heures, et la viabilité résiduelle est mesurée par CellTiter-Glo [48]. La concentration inhibitrice 50 % (IC50) est déterminée et comparée à celle des cellules ne portant pas le transgène HSV-TK, documentant la sélectivité du système.

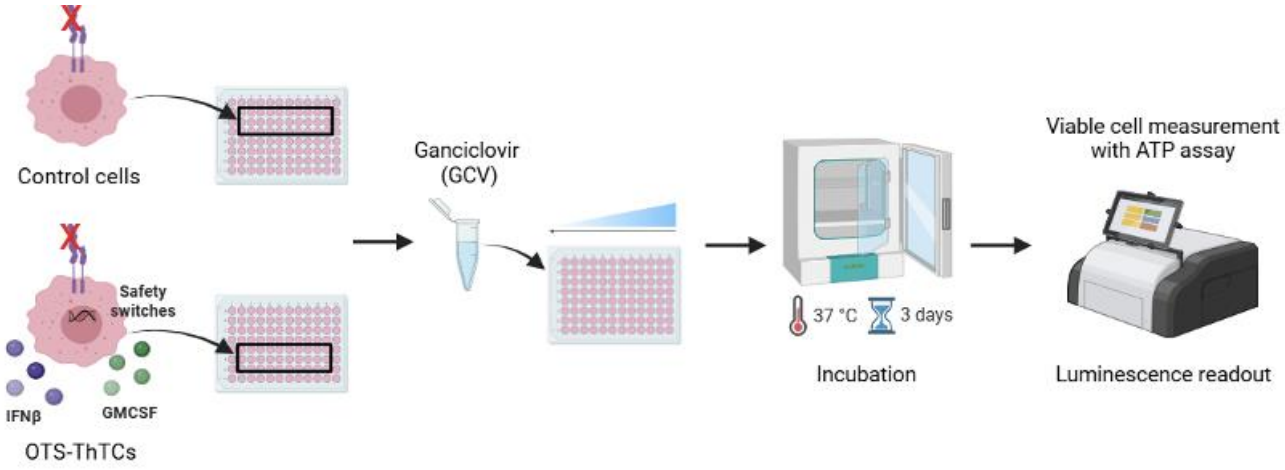


Figure 23 : *Template du test de Ganciclovir*

Le panneau schématise le protocole d'évaluation du système suicide : des cellules contrôles et des OTS-ThTC sont exposées à des concentrations croissantes de ganciclovir (GCV), incubées 3 jours à 37 °C, la viabilité étant ensuite quantifiée par dosage de l'ATP (lecture de luminescence).

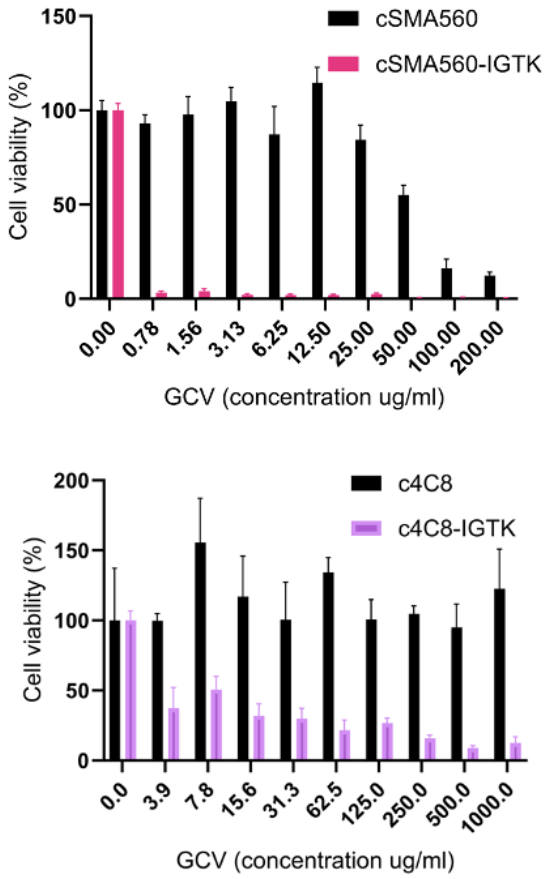


Figure 24 : *Viabilité cellulaire des cellules cSMA560-IGTK / c4C8-IGTK et des cellules contrôles traitées avec des concentrations croissantes de GCV ; les barres représentent les SEM (erreurs standards de la moyenne).*

Les histogrammes rapportent la viabilité cellulaire (en pourcentage) en fonction de concentrations croissantes de ganciclovir (µg/ml), pour les lignées cSMA560 et c4C8 et leurs versions modifiées exprimant la thymidine kinase (« -IGTK »). Les cellules « -IGTK » voient leur viabilité chuter fortement dès les faibles concentrations de GCV, tandis que les lignées parentales conservent une viabilité élevée sur une large gamme de doses, illustrant la sensibilité sélective des cellules thérapeutiques au ganciclovir.

5.3. Études prophylactiques

5.3.1 Modèle orthotopique et protocole de vaccination préventive

Les études in vivo d'immunoprophylaxie anti-tumorale visent à déterminer si l'implantation de ThTC (individuelles ou mixtes) chez des souris C57BL/6 immunocompétentes induit une mémoire immunitaire protectrice contre un second challenge tumoral. Le protocole repose

surdeux étapes séquentielles : **(i)** l'établissement d'un modèle de GBM primaire par implantation orthotopique stéréotaxique de ThTC (individuelles ou en mélange) dans la boîte crânienne, sans croissance tumorale attendue à cette étape ; **(ii)** le re-challenge des souris ayant survécu à cette première implantation, par injection orthotopique de cellules tumorales parentales non modifiées (CT2A ou GL261). Le critère de succès est l'absence de croissance tumorale après l'implantation initiale des ThTC et le rejet du re-challenge tumoral chez les souris ainsi vaccinées, démontrant l'induction d'une immunité anti-tumorale spécifique et durable, un phénomène de mémoire immunitaire distinct des paradigmes prophylactique (protection avant exposition) ou curatif (traitement d'une tumeur déjà établie) au sens strict. Les animaux sont suivis quotidiennement pour la détection de signes neurologiques et pesés hebdomadairement ; la survie globale est enregistrée selon des critères prédéfinis (perte de poids > 20 %, signes neurologiques sévères) et analysée par la méthode de Kaplan-Meier avec test du log-rank pour la comparaison inter-groupes.

Deux modèles tumoraux ont été testés en parallèle, chacun comparant trois conditions (n = 5 souris par groupe) :

- la lignée tumorale sauvage (SMA560-FmC ou 4C8-FmC),
- la lignée contrôle non modifiée (cSMA560-FmC ou c4C8-FmC),
- la lignée exprimant les OTS-ThTC (cSMA560-IGTK-FmC ou c4C8-IGTK-FmC).

Les souris survivantes à cette première implantation ont ensuite été re-challengées dans l'hémisphère controlatéral, afin de tester l'établissement d'une mémoire immunitaire anti-tumorale.

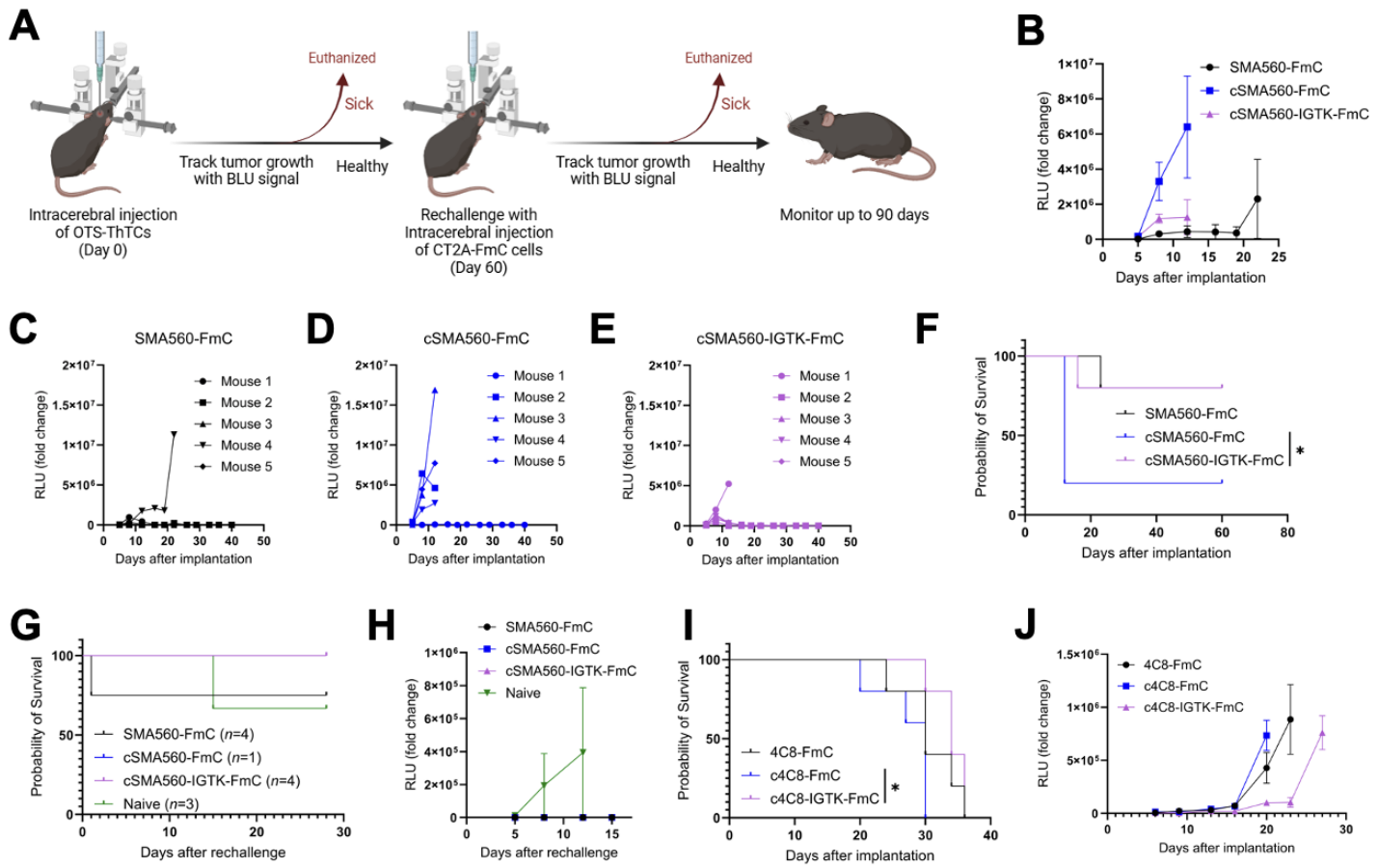


Figure 25 : *Les OTS-ThTCs induisent un effet vaccin et une immunité à long terme contre les cellules de GBM dans des modèles tumoraux murins.*

Modèle SMA560 : implantation primaire

La progression tumorale (signal Fluc) a été suivie pour les trois groupes, globalement *(Figure 25B)* puis individuellement pour chaque souris *(Figures 25C–E)*. La survie correspondante est présentée en Figure 25F.

Modèle SMA560 : rechallenge et effet vaccin

Deux mois après la première implantation, les souris survivantes ont été re-challengées avec des cellules CT2A-FmC , une lignée de GBM murin très agressive, moléculairement distincte des lignées initiales (marqueurs de surface différents). Toutes les souris précédemment implantées avec cSMA560-FmC (n = 1) ou cSMA560-IGTK-FmC (n = 4) ont rejeté cette nouvelle tumeur et survécu *(Figure 25G)*.

Ce résultat démontre qu'une première exposition à un sous-type tumoral donné peut induire une protection croisée contre un second sous-type de GBM, même moléculairement différent

signature d'une immunité mémoire à large spectre plutôt que d'une simple reconnaissance antigénique spécifique.

Aucune différence significative n'a été observée entre les groupes SMA560-FmC et cSMA560-IGTK-FmC (n = 4 par groupe après exclusion d'une souris ayant perdu l'usage de son membre gauche le lendemain du rechallenge, un événement attribué à la procédure chirurgicale plutôt qu'à la progression tumorale).

Chez les souris naïves ayant reçu uniquement du CT2A-FmC (n = 3), une baisse de la probabilité de survie a été observée par rapport aux souris pré-exposées, mais cette différence n'est pas statistiquement significative, l'effectif restant faible. L'imagerie Fluc confirme néanmoins une croissance tumorale plus agressive chez les souris naïves que chez les souris pré-implantées (SMA560-FmC, cSMA560-FmC ou cSMA560-IGTK-FmC) *(Figure 25H)*, suggérant qu'une exposition initiale aux OTS-ThTC favorise l'établissement d'une immunité protectrice à long terme.

Le rejet spontané de CT2A-FmC par certaines souris naïves est un phénomène connu, qui dilue la puissance statistique de cette comparaison avec un si petit effectif (n = 3). Augmenter le nombre de souris naïves améliorerait la fiabilité de l'analyse. Une expérience de rechallenge est également prévue avec une lignée CT2A récurrente obtenue en traitant des souris porteuses de CT2A-FmC au témozolomide (TMZ, traitement clinique standard du GBM) puis en isolant les cellules issues de la récidive tumorale. Cette lignée, au phénotype plus agressif, ne devrait pas être rejetée spontanément par des souris naïves, ce qui permettrait de mieux discriminer l'effet vaccin spécifique des OTS-ThTC.

Modèle 4C8

Le second modèle tumoral a suivi le même schéma avec la lignée 4C8 (4C8-FmC, c4C8-FmC, c4C8-IGTK-FmC ; n = 5/groupe). Les résultats de survie *(Figure 25I)* montrent une amélioration significative de la survie dans le groupe c4C8-IGTK-FmC par rapport au groupe c4C8-FmC ($p < 0,05$). Aucune différence significative n'a été observée entre les groupes 4C8-FmC et c4C8-IGTK-FmC, bien que la courbe de survie soit tendanciellement plus favorable pour ce dernier groupe (progression tumorale plus tardive). L'imagerie Fluc *(Figure 25J)* confirme une croissance tumorale plus agressive dans les groupes 4C8-FmC et c4C8-FmC que dans le groupe c4C8-IGTK-FmC.

Ces données indiquent que la sécrétion combinée d'IFN-β et de GM-CSF par les cellules c4C8-IGTK-FmC ralentit la croissance tumorale par rapport aux cellules 4C8 sauvages, confortant l'intérêt de cette bithérapie comme stratégie vaccinale contre le GBM.

Aucune souris n'a survécu jusqu'au terme de cette expérience, empêchant la réalisation du rechallenge. Cette étude renseigne ainsi sur le devenir des cellules 4C8-IGTK en l'absence

d'activation du système de sécurité par le ganciclovir (GCV, activation du kill switch), une expérience avec activation du GCV permettrait de déterminer si un effet vaccin peut malgré tout être obtenu après élimination des cellules.

Au vu de ces résultats, les expériences suivantes se concentreront exclusivement sur les lignées cSMA560 et cSMA560-IGTK, plus robustes sur le plan de la survie et donc mieux adaptées à l'étude du rechallenge.

5.3.2 Détermination de l'efficacité thérapeutique pour le GBM

Afin d'évaluer l'efficacité thérapeutique de l'approche ThTC dans un contexte immunocompétent et syngénique, un protocole en trois étapes a été mis en place chez la souris C57BL/6, s'appuyant sur deux lignées murines de gliome largement validées dans la littérature : CT2A et GL261.

Des cellules tumorales CT2A et GL261 sont implantées par voie orthotopique (injection cérébrale par stéréotaxique) chez des souris C57BL/6 immunocompétentes, permettant l'établissement de tumeurs cérébrales primaires reproduisant, dans leurs grandes lignes, l'architecture et le profil immunosuppresseur du GBM humain. L'utilisation de deux lignées aux profils immunogéniques distincts (GL261 étant classiquement considérée comme plus immunogène que CT2A, plus agressive et davantage réfractaire aux traitements) permet de tester la robustesse de l'approche thérapeutique dans des contextes tumoraux de sévérité différente.

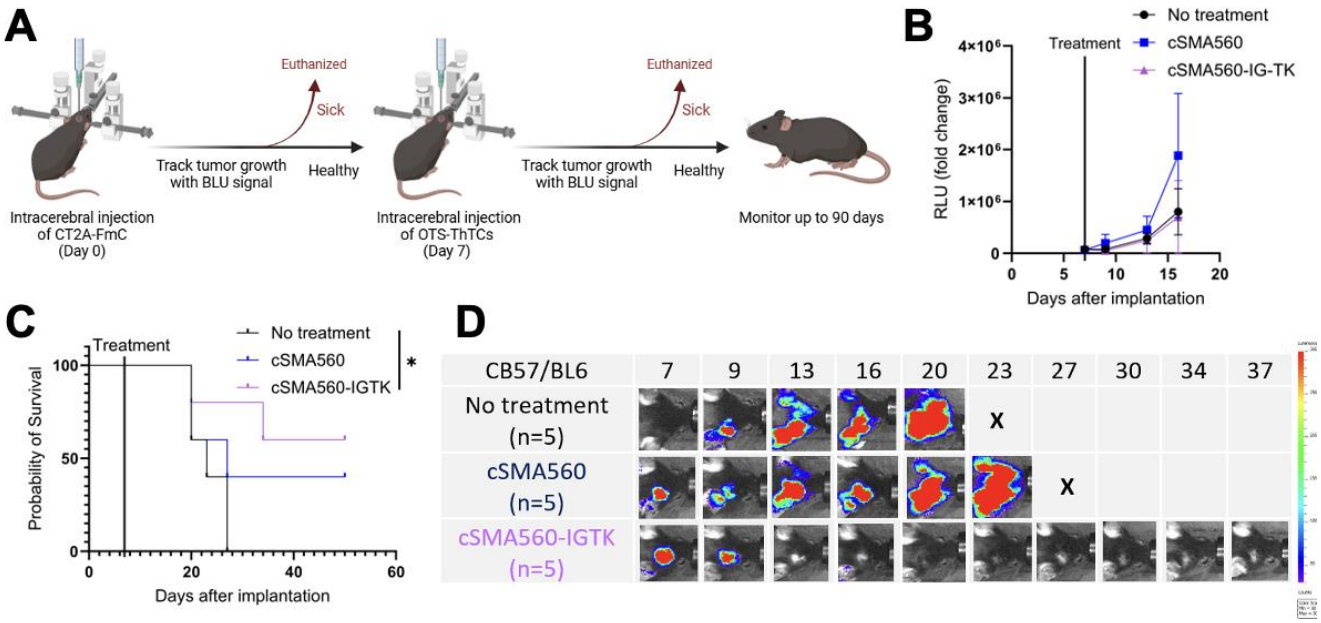


Figure 26 : *Les cellules cSMA560-IGTK exercent un effet thérapeutique en ciblant et en éliminant les cellules de GBM murines in vivo.* **(A)** Schéma du calendrier expérimental de l'implantation intracrânienne de cellules de GBM chez la souris, utilisé pour évaluer l'effet thérapeutique des OTS-

ThTCs. BLU : bioluminescence.**(B)** Courbe représentant le signal Fluc chez des souris C57BL/6 après implantation intracrânienne de cellules CT2A-FmC, puis traitées avec des cellules cSMA560 (n = 5), cSMA560-IGTK (n = 5) ou laissées sans traitement (n = 5). Les barres représentent les erreurs standards de la moyenne (SEM).**(C)** Courbes de Kaplan-Meier montrant la probabilité de survie des souris C57BL/6 implantées avec des cellules CT2A-FmC et traitées avec cSMA560 (n = 5), cSMA560-IGTK (n = 5) ou sans traitement (n = 5). Les données ont été analysées par un test de log-rank (Mantel-Cox). **(D)** Images représentatives du signal Fluc provenant des cellules CT2A-FmC chez des souris C57BL/6 après traitement avec cSMA560, cSMA560-IGTK ou en absence de traitement. Les nombres indiquent les jours après implantation ; les croix indiquent le décès des animaux.

L'imagerie de bioluminescence Fluc (BLI) de CT2A-FmC a révélé une croissance tumorale agressive chez les souris traitées par cSMA560, comparativement aux souris traitées par cSMA560-IGTK et aux souris non traitées *(Fig. 26B)*. Après quelques jours suivant l'implantation, la figure montre qu'avec cSMA560-IGTK, le signal Fluc est légèrement inférieur à celui du groupe non traité ; ces résultats ne sont pas significatifs, mais l'efficacité des OTS-ThTC est ici sous-estimée, car à J7 seules 12 souris présentaient une tumeur visible avaient été traitées soit par cSMA560, soit par cSMA560-IGTK ; ainsi, dans le groupe non traité, 2 souris présentaient une tumeur visible et 3 n'en présentaient pas, ce qui a entraîné un signal moyen plus faible en début d'expérience dans le groupe non traité.

Un bénéfice significatif de survie est observé dans le groupe cSMA560-IGTK par rapport au groupe non traité ($p < 0,05$) *(Fig. 26C)*, signifiant que les cellules cSMA560-IGTK exercent un effet thérapeutique en ciblant et en tuant les cellules CT2A-FmC grâce à l'IFN-β et au GM-CSF. Il est intéressant de noter que l'implantation de cSMA560 a également amélioré la probabilité de survie, bien que de façon non significative, en diminuant la croissance tumorale (CT2A-FmC) de deux souris. Par ailleurs, après implantation de 5×10^4 cellules cSMA560-FmC, la probabilité de survie était de 20 % *(Fig. 25F)*, tandis qu'après implantation de CT2A-FmC et de 1×10^6 cellules cSMA560, la probabilité de survie était de 40 % *(Fig. 26C)*, ce qui signifie qu'avec un nombre plus important de cellules implantées, la probabilité de survie était meilleure. Cela pourrait suggérer des mécanismes résultant de l'interaction in vivo entre deux tumeurs différentes, permettant le recrutement de cellules immunitaires. Des études approfondies sur cette observation surprenante doivent être entreprises afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués.

Une souris de chaque groupe a été représentée pour illustrer la tendance de l'étude *(Fig. 24D)* et montrer l'efficacité de cSMA560-IGTK, sachant qu'après quelques jours, la plupart des souris ne présentaient plus de signal tumoral. Le traitement par cSMA560-IGTK est très prometteur car, malgré l'invalidation du récepteur IFNAR1 et la sécrétion d'un facteur de croissance tumoral (puisqu'il s'agit d'une cellule tumorale), la libération de protéines thérapeutiques réduit la croissance tumorale en ciblant et en tuant les cellules tumorales, et améliore significativement la survie par rapport au groupe non traité.

La répétition de cette expérience avec des cellules GL261-FmC est nécessaire afin de démontrer que cSMA560-IGTK peut traiter différents sous-types de tumeurs.

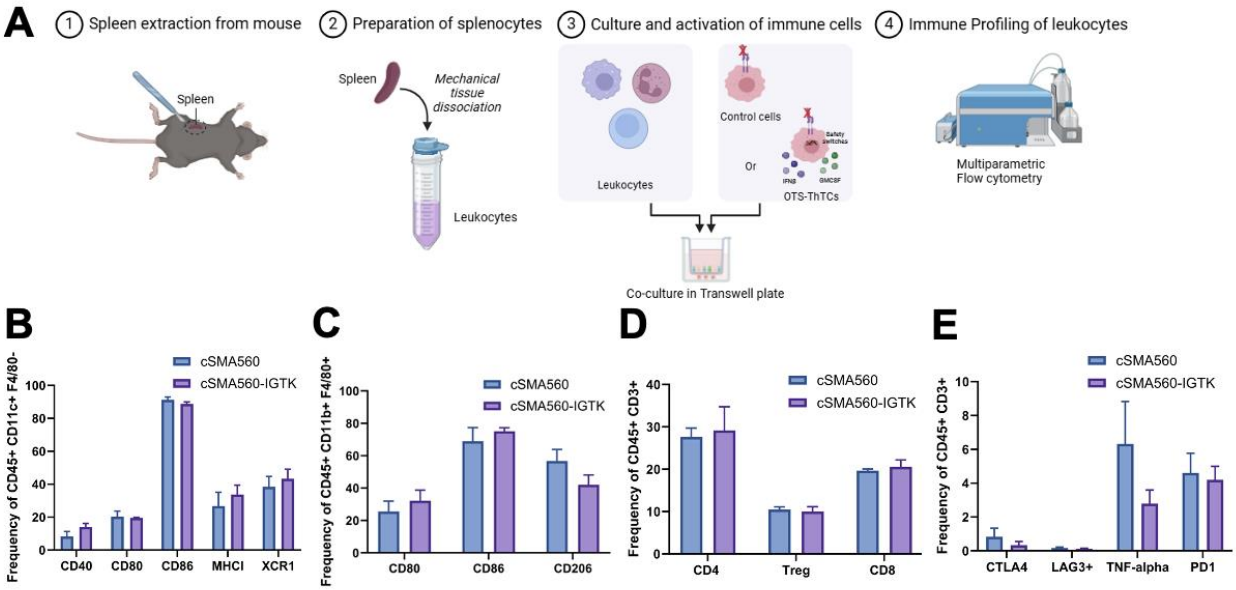
Le rechallenge des souris survivantes avec des lignées cellulaires récurrentes ou métastatiques pourrait être envisagé pour démontrer l'efficacité constante du traitement par rapport aux groupes contrôles.

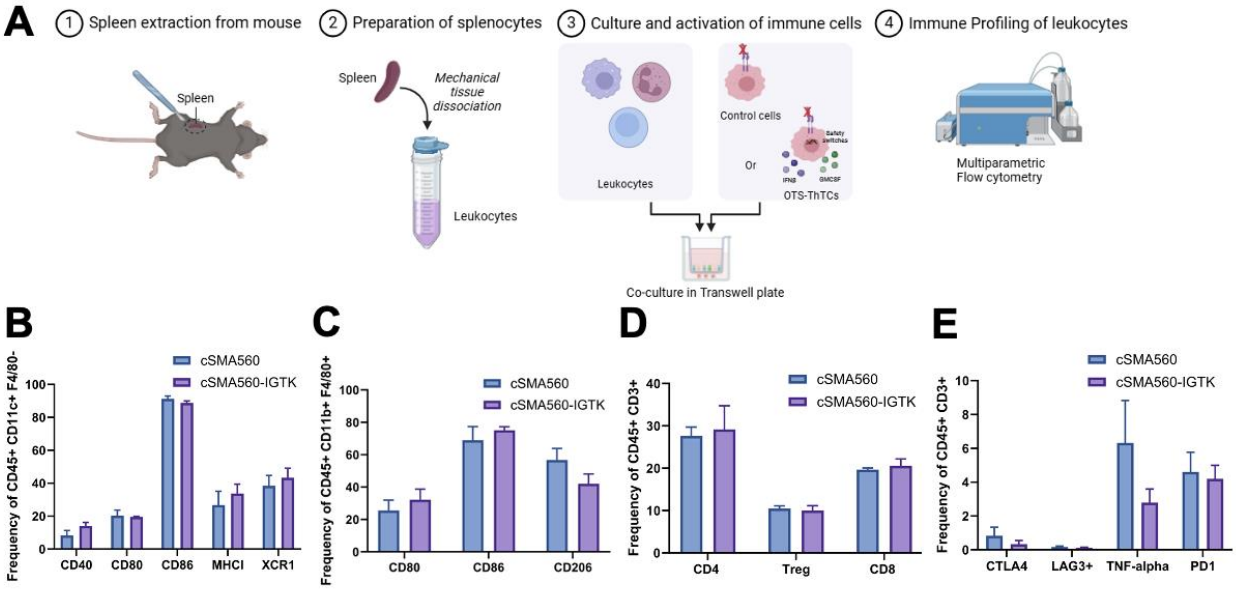
Les cellules cSMA560-IGTK inhibent la croissance tumorale et améliorent la survie sans recours au GCV ; toutefois, une réduction de la masse tumorale et une amélioration de la survie sont attendues avec l'ajout de GCV, grâce à l'effet bystander.

5.3.3. Profilage immunitaire et modulation du microenvironnement tumoral par les cellules cSMA560-IGTK

Afin d'approfondir la compréhension du mécanisme d'action des OTS-ThTC sur les cellules immunitaires murines, des expériences ex vivo ont été réalisées. Une rate a été prélevée chez une souris, et les leucocytes en ont été isolés grâce à une dissociation mécanique du tissu. Les leucocytes ont été cultivés avec cSMA560 ou cSMA560-IGTK pendant 2 jours, puis une cytométrie en flux multiparamétrique a été réalisée en observant différents marqueurs des cellules immunitaires murines *(Fig. 27A)*. Toutes les données ont été analysées par test log-rank (Mantel-Cox) et ont révélé que les résultats ne sont pas significatifs, bien qu'ils indiquent une tendance. Cette expérience devrait être répétée en co-cultivant les cellules immunitaires pendant une période plus longue avec les cellules contrôles et les OTS-ThTC.

Cependant, le diagramme en boîte (box plot) présentant le profil de la population de cellules dendritiques (DC) *(Fig. 27B)* indique une légère augmentation du marqueur CD40, marqueur d'activation des DC. De plus, un nombre plus élevé de DC matures (CD45+/CD11c+/F4/80-/CMH de classe I) et de DC à capacité de présentation croisée (CD45+/CD11c+/F4/80-/XR1) est observé dans le groupe cSMA560-IGTK comparativement au groupe cSMA560.





<u>Figure 27 :</u> Les cellules cSMA560-IGTK tendent à induire une modification de la population des cellules immunitaires murines et à réduire l'épuisement des lymphocytes T. **(A)** Schéma expérimental des expériences ex vivo visant à étudier l'effet des OTS-ThTCs sur les leucocytes murins. **(B-E)** Diagrammes en boîte (box plots) présentant le profil immunitaire des leucocytes après 2 jours de co-culture avec des cellules cSMA560 (n = 3) ou cSMA560-IGTK (n = 3).**(B)** Diagramme en boîte montrant le profil de la sous-population de cellules dendritiques (DC).**(C)** Diagramme en boîte montrant le profil de la sous-population de macrophages.**(D-E)** Diagrammes en boîte montrant le profil des sous-populations de lymphocytes T.Toutes les données ont été analysées par un test de log-rank (Mantel-Cox) (**B, C, D et E**)

Le diagramme en boîte présentant le profil de la population de macrophages *(Fig. 27C)* montre une augmentation des macrophages de type M1 (CD45+/CD11b+/F4/80+/CD80+ et CD45+/CD11b+/F4/80+/CD86+), qui induisent une réponse anti-tumorale, ainsi qu'une diminution des macrophages de type M2 (CD45+/CD11b+/F4/80+/CD206+), immunosuppresseurs, dans le groupe cSMA560-IGTK comparativement au groupe cSMA560. Par ailleurs, le diagramme en boîte présentant le profil de la population de lymphocytes T *(Fig. 27D et 27E)* indique une diminution du TNF-alpha dans le groupe cSMA560-IGTK comparativement à cSMA560, un marqueur d'activation des lymphocytes T, mais également exprimé par les lymphocytes T épuisés (exhausted), qui ne sont plus efficaces contre les cellules tumorales. De fait, une diminution des marqueurs d'épuisement lymphocytaire T est observée dans le groupe cSMA560-IGTK par rapport à cSMA560 (CD45+/CD3+/PD1+, CD45+/CD3+/CTLA4+ et CD45+/CD3+/LAG3+).

Les modifications observées dans les populations de cellules immunitaires sont vraisemblablement dues à l'IFN-β, qui exerce des effets immunostimulants sur diverses cellules immunitaires, notamment les DC, ainsi qu'au GM-CSF, qui favorise la prolifération et le recrutement des DC ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires. Ces résultats sont prometteurs, notamment au regard de l'un des principaux défis d'un nouveau traitement pour le GBM : recruter

les macrophages les plus cytotoxiques (M1) et les lymphocytes T au sein du microenvironnement tumoral, afin de neutraliser les macrophages immunosuppresseurs (M2) et les lymphocytes Treg.

Il est important de reconnaître les limites du profilage immunitaire, qui met en évidence des variations des populations cellulaires et leurs rôles potentiels. Cependant, cette méthode n'explore pas les mécanismes moléculaires et cellulaires précis à l'origine de ces changements. Les voies de signalisation, les modifications transcriptionnelles ou les interactions intercellulaires ayant conduit à cette augmentation restent à élucider.

VI.Systèmes de sécurité et contrôle

6.1.Risques liés aux cellules vivantes modifiées

L'utilisation de cellules tumorales vivantes comme agents thérapeutiques introduit une catégorie de risques biologiques spécifiques, absents des approches pharmacologiques conventionnelles et des vaccins cellulaires irradiés de première et deuxième génération. Contrairement à une cellule irradiée, incapable de se diviser, une cellule vivante conserve par définition son potentiel réplicatif, ce qui impose d'anticiper et de neutraliser ce potentiel avant toute administration chez l'homme. Ces risques ne sont pas théoriques : ils constituent le principal obstacle réglementaire à la translation clinique de la plateforme ThTC, et leur maîtrise est la condition *sine qua non* d'une approbation par les autorités de santé[48].

6.1.1. Risque de prolifération incontrôlée

Le premier risque, et le plus immédiat, est celui d'une prolifération incontrôlée des ThTC dans le parenchyme cérébral de l'hôte. Bien que génétiquement modifiées pour exprimer des molécules thérapeutiques, les ThTC restent, à leur origine, des cellules de glioblastome : elles conservent donc leur capacité proliférative intrinsèque, ainsi que leur résistance connue à l'apoptose et leur plasticité phénotypique, c'est-à-dire leur capacité à adopter des états transcriptionnels favorisant leur propre survie et leur invasion dans le tissu environnant[18]. Autrement dit, la modification génétique ajoute une fonction thérapeutique aux cellules, mais ne supprime pas leurs propriétés tumorales de départ. L'administration intracrânienne de cellules vivantes expose donc, en théorie, le patient au risque de développer une tumeur iatrogène au site même de l'injection , un événement qui, même s'il reste statistiquement rare, serait cliniquement catastrophique dans le contexte d'une maladie déjà mortelle. C'est précisément ce risque qui justifie l'existence de systèmes de sécurité capables d'éliminer les ThTC à volonté (détaillés en 6.2).

6.1.2. Risque mutagène et dérive génomique

Le deuxième risque est mutagène, et se manifeste à plus long terme. Les ThTC sont des cellules en division active : à chaque cycle de multiplication, que ce soit lors de leur expansion en culture (ex vivo) ou lors de leur persistance après administration au patient (in vivo), elles accumulent des mutations somatiques de façon spontanée. Ce phénomène, appelé dérive génomique, est universel dans toute cellule tumorale maintenue en culture, mais il est accéléré par le stress oxydatif inhérent aux conditions de culture. Il pourrait en théorie être encore accentué par les manipulations d'édition génomique elles-mêmes (CRISPR notamment), si des réparations aberrantes surviennent sur des sites hors-cibles non détectés lors du contrôle qualité[45]. Le danger n'est donc pas la mutation en elle-même qui est un phénomène biologique normal

mais la possibilité qu'une mutation acquise confère par hasard un avantage de survie à la cellule, une résistance aux systèmes de sécurité, ou des propriétés oncogéniques augmentées.

6.1.3. Risque d'échappement aux kill switches

Le troisième risque découle directement des deux premiers : c'est celui de l'échappement génétique aux kill switches, les mécanismes moléculaires conçus pour détruire les ThTC sur commande. Ce risque est comparable, par son principe, à l'émergence de résistances aux antibiotiques : si l'activation d'un kill switch élimine préférentiellement les cellules les plus sensibles sans atteindre l'intégralité de la population, les cellules les moins sensibles survivent et se retrouvent sélectionnées, un phénomène de pression sélective classique en biologie évolutive. Une population de ThTC résistante au système de sécurité peut alors émerger, conduisant à une persistance non contrôlable des cellules thérapeutiques. Cet échappement peut avoir plusieurs origines moléculaires : une mutation directe dans le transgène codant le kill switch, une répression épigénétique du promoteur pilotant son expression (le gène est intact mais n'est plus transcrit), ou encore la sélection de clones porteurs d'altérations en aval, dans les voies apoptotiques elles-mêmes ciblées par le système de sécurité.

6.2. Stratégies de contrôle et systèmes de sécurité

6.2.1. Principe d'orthogonalité des systèmes de sécurité

Face à ces trois risques, la réponse retenue repose non pas sur un système de sécurité unique, mais sur l'intégration de plusieurs kill switches fonctionnant selon des mécanismes d'action entièrement distincts et indépendants. Ce principe, dit d'orthogonalité, signifie qu'une mutation ou une résistance apparue contre l'un des systèmes n'a, par construction, aucune raison de conférer une résistance aux autres, puisqu'ils n'empruntent pas les mêmes voies moléculaires. Cette redondance orthogonale constitue le principe architectural central des systèmes de sécurité des ThTC, et elle correspond à une exigence raisonnablement anticipable de la part des agences réglementaires pour tout produit de thérapie avancée reposant sur des cellules tumorales vivantes[48].

6.2.2. Suicide génique HSV-TK/GCV

Le premier système, HSV-TK/GCV (thymidine kinase du virus Herpès Simplex, associée au ganciclovir), est le kill switch le plus anciennement développé et le mieux documenté sur le plan clinique. Son fonctionnement repose sur une différence d'affinité enzymatique : le ganciclovir, une prodrogue inactive administrée par voie systémique, est phosphorylé par la thymidine kinase virale (HSV-TK), une enzyme que seules les ThTC modifiées expriment, en ganciclovir monophosphate, lui-même converti en ganciclovir triphosphate par les kinases cellulaires endogènes. Cette forme triphosphate s'incorpore dans l'ADN en cours de réplication et bloque

la polymérase ADN, provoquant un arrêt de la réplication et une mort par apoptose, mais uniquement dans les cellules exprimant HSV-TK. Les cellules qui n'expriment pas cette enzyme phosphorylent le ganciclovir avec une efficacité environ 1000 fois inférieure, ce qui garantit une sélectivité remarquable du traitement pour les ThTC, épargnant les cellules saines de l'hôte. Un avantage supplémentaire de ce système dans le contexte des ThTC est l'effet *bystander* : le ganciclovir triphosphate produit dans une cellule HSV-TK$^+$ peut diffuser vers les cellules voisines via les jonctions gap communicantes, étendant ainsi l'effet cytotoxique au-delà des seules cellules exprimant directement le transgène, ce qui réduit la probabilité qu'un mutant résistant isolé échappe au traitement. En clinique, ce système a déjà démontré sa faisabilité et son efficacité comme dispositif de sécurité dans le contexte des thérapies CAR-T, ce qui fournit une base d'expérience clinique directement transposable à la plateforme ThTC[67].

6.2.3. Système iCasp9

Le deuxième système, iCasp9, repose sur un principe différent : la dimérisation chimio-inductible d'une forme modifiée de la caspase 9, un effecteur proximal de la voie intrinsèque (mitochondriale) de l'apoptose. Les ThTC expriment une forme tronquée de la caspase 9, fusionnée à un domaine de dimérisation qui reste inactif en conditions basales, la cellule fonctionne normalement tant qu'aucun signal n'est délivré. En présence d'une petite molécule inductrice, l'AP1903, ce domaine s'oligomérise, ce qui entraîne l'auto-activation de la caspase 9 et déclenche la cascade des caspases effectrices 3 et 7, aboutissant à une mort par apoptose. Comparé au système HSV-TK, ce mécanisme présente une cinétique d'activation plus rapide, puisqu'il ne dépend pas d'un cycle de réplication cellulaire pour être effectif. Son profil de tolérance a par ailleurs déjà été démontré chez des patients dans le cadre de plusieurs essais cliniques de phase I[48].

6.2.4. Système iRIPK3 et nécroptose immunogène

Le troisième système, iRIPK3 (nécroptose immunogène inductible), représente l'innovation la plus récente de l'arsenal des kill switches des ThTC, et illustre une convergence originale entre sécurité et immunogénicité. Il repose sur la dimérisation inductible de RIPK3 (*Receptor-Interacting Protein Kinase 3*), une kinase centrale de la voie de la nécroptose, une forme de mort cellulaire programmée distincte de l'apoptose, caractérisée non pas par un repli ordonné de la cellule mais par la perméabilisation de sa membrane plasmique, entraînant une libération massive de signaux de danger, les DAMPs (*Damage-Associated Molecular Patterns*)[49].

L'intérêt conceptuel majeur de ce système réside précisément dans la nature immunogène de ce mode de mort. Là où l'apoptose induite par HSV-TK ou par iCasp9 est relativement silencieuse sur le plan immunologique, la cellule meurt proprement, sans alerter le système immunitaire environnant, la nécroptose induite par iRIPK3 génère au contraire une libération massive de signaux de danger qui recrutent et activent les cellules dendritiques au sein du microenvironnement tumoral. L'activation d'iRIPK3 n'est donc pas seulement un mécanisme d'arrêt de

sécurité destiné à éliminer les ThTC en cas de besoin : elle constitue simultanément un amplificateur immunologique terminal, renforçant la réponse adaptative initiée par les ThTC au moment même de leur élimination programmée. *(Figure 28)*

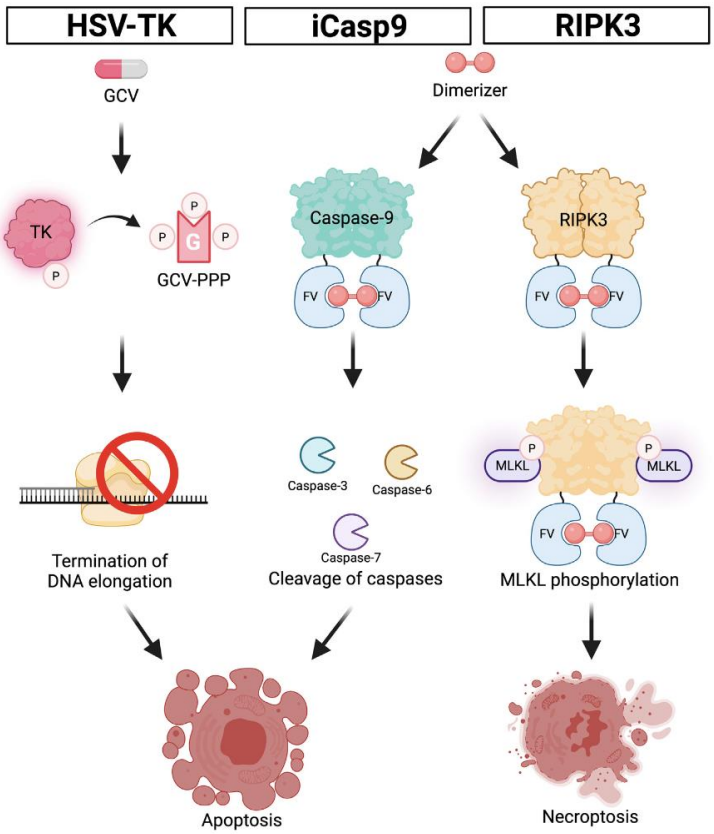


Figure 28 : *Systèmes suicides dans les thérapies cellulaires anticancéreuses, adapté de Chen K-S, Shah K. 2025*[66]

VII. Développement translationnel, réglementaire et industriel des ThTC

7.1. Défis de développement

Le choix entre un modèle autologue patient-spécifique et un modèle allogénique off-the-shelf conditionne l'ensemble de l'architecture de fabrication, du modèle économique et de la stratégie réglementaire. Le modèle autologue, s'il offre une couverture antigénique maximale, se heurte à des taux d'échec dans le GBM, une variabilité inter-lots incompatible avec les exigences réglementaires, et à un coût de production non scalable[7]. Le modèle allogénique off-the-shelf, choisi comme stratégie de développement prioritaire pour la plateforme ThTC, impose en contrepartie une rigueur extrême dans la sélection et la caractérisation des lignées fondatrices et une surveillance continue de la stabilité phénotypique et génomique des banques cellulaires au cours du temps.

7.1.1. Fabrication GMP

La fabrication des ThTC à des fins cliniques requiert le respect des Bonnes Pratiques de Fabrication (GMP, Good Manufacturing Practice) applicables aux ATMP selon le règlement européen (CE) n°1394/2007 et les guidelines FDA 21 CFR Part 1271. Ces standards imposent des exigences exhaustives couvrant l'ensemble de la chaîne de production : qualification des équipements et des installations, validation des procédés génomiques, contrôle de la qualité microbiologique des milieux et des réactifs, traçabilité lot-à-lot de chaque étape de fabrication, et libération des lots. La validation du processus sur au moins trois lots consécutifs indépendants est une exigence minimale avant la soumission d'un dossier IND (Investigational New Drug) aux exigences réglementaires.

7.1.2. Contrôle qualité

La libération de chaque lot de ThTC pour usage clinique repose sur la conformité à un ensemble d'attributs critiques de qualité (CQA) dont la liste, les spécifications et les méthodes de test doivent être préalablement validées et soumises aux agences dans le cadre du dossier pharmaceutique.

7.1.3. Scalabilité

La cryopréservation constitue un enjeu technologique critique pour le modèle off-the-shelf, conditionnant la durée de conservation des lots, leur distribution logistique et leur viabilité au moment de l'administration. Les paramètres critiques incluent la composition du milieu de cryopréservation, la vitesse de congélation et les conditions de décongélation.

7.2. Défis réglementaires

7.2.1. Thérapies cellulaires et ATMP

Les ThTC se positionnent dans la catégorie des médicaments de thérapie innovante (ATMP) combinant deux sous-catégories : les médicaments de thérapie cellulaire somatique (contenant des cellules vivantes modifiées à des fins thérapeutiques) et les médicaments de thérapie génique (contenant des séquences génétiques intégrées à visée thérapeutique).

7.2.2. Exigences FDA et EMA

Ce double positionnement implique l'application simultanée des guidelines spécifiques à ces deux catégories (EMA/CAT pour les ATMP en Europe, FDA Office of Tissues and Advanced Therapies pour les États-Unis), avec des exigences d'études de génotoxicité, d'oncogénicité et de biodistribution spécifiquement adaptées aux produits cellulaires vivants génétiquement modifiés.

La surveillance à long terme de la sécurité des patients traités par ThTC constitue une exigence réglementaire spécifique aux ATMP, motivée par la nature vivante et génétiquement modifiée du produit. Les risques à surveiller incluent le développement de tumeurs iatrogènes dérivées des ThTC (suivi par IRM cérébrale à 3, 6, 12 et 24 mois post-traitement), l'activation virale secondaire liée au vecteur lentiviral d'intégration (si utilisé), la persistance de ThTC au-delà de la durée prévue (suivi par qPCR spécifique des séquences transgéniques dans le sang et les LCR), et les effets immunologiques à distance (suivi des populations lymphocytaires périphériques, auto-immunité). La réglementation européenne impose un suivi minimal de 15 ans pour les ATMP géniques, exigence susceptible de s'appliquer aux ThTC en raison de leurs transgènes intégrés.

7.3. Défis cliniques

7.3.1. Conception des essais cliniques

La définition de la dose optimale de ThTC, exprimée en nombre de cellules viables par administration, en fréquence d'administration et en localisation du site d'injection est l'objectif primaire des essais de phase I.

7.3.2. Sélection des patients

La définition de la population cible pour les essais cliniques de phase I et II constitue un enjeu stratégique majeur, conditionnant à la fois la puissance statistique des essais et la probabilité de détection d'un signal d'efficacité dans des populations aux caractéristiques biologiques hétérogènes. Les critères d'inclusion prioritaires sont : GBM IDH-wildtype nouvellement diagnostiqué, résection macroscopiquement complète ou subtotale (permettant l'administration intracrânienne de ThTC dans la cavité). La méthylation du promoteur MGMT, bien que prédictive de la réponse au TMZ[21], n'est pas un critère de sélection pour les ThTC dont le mécanisme d'action est indépendant de la voie MGMT.

7.3.3. Biomarqueurs de réponse

Les paramètres pharmacodynamiques de suivi incluent la cinétique de persistance des ThTC dans le parenchyme cérébral (suivi par IRM de diffusion et spectroscopie), l'évolution du profil immunitaire sanguin périphérique (expansion des populations T spécifiques de la tumeur, biomarqueurs d'activation) et les paramètres d'imagerie de réponse tumorale.

VIII. Perspectives translationnelles et industrielles

8.1. État du marché des thérapies cellulaires

Le marché mondial des thérapies cellulaires regroupant les thérapies par cellules CAR-T, les vaccins cellulaires et, plus récemment, les plateformes de cellules tumorales modifiées comme les ThTC connaît une croissance portée principalement par les succès commerciaux des thérapies CAR-T dans les hémopathies malignes (lymphomes, leucémies). Cette dynamique de marché repose toutefois sur un modèle économique et un contexte biologique très différents de ceux du glioblastome, ce qui explique pourquoi les ThTC ne peuvent pas simplement répliquer la stratégie commerciale des CAR-T (voir 7.4.2). *(Figure 29)*

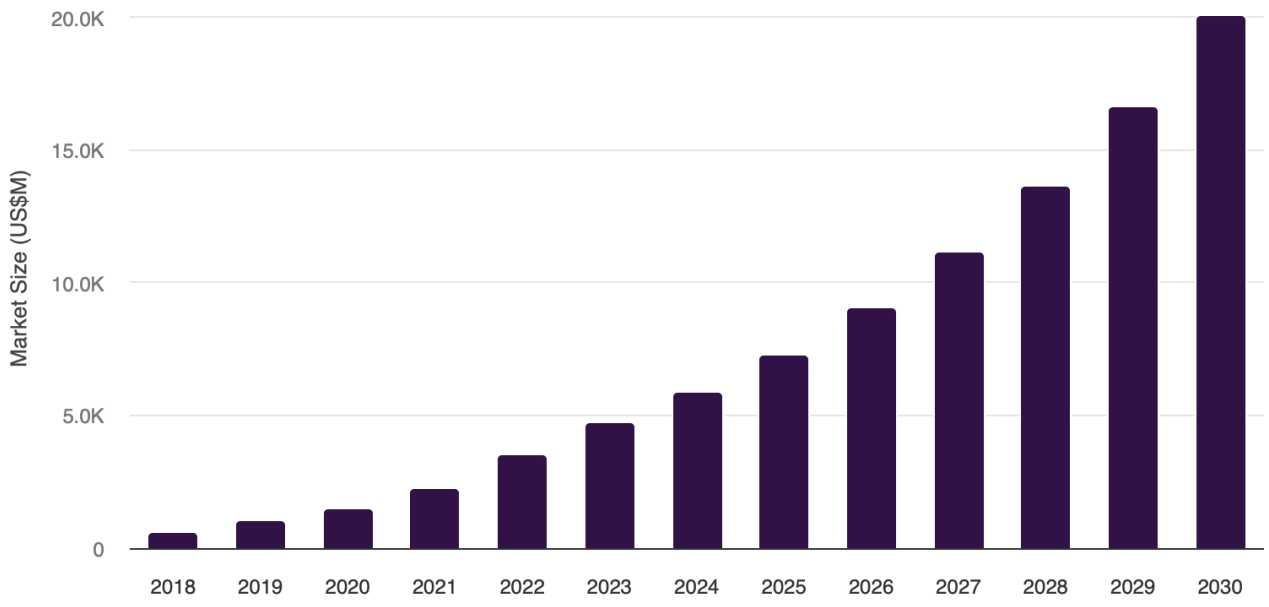


Figure 29 : *Marché mondial des thérapies cellulaires (2018-2030), adapté de Grand View Research*

Un indicateur économique central pour évaluer la viabilité commerciale de toute thérapie cellulaire est le COGS (*Cost Of Goods Sold*, ou coût des marchandises vendues) : il désigne le coût réel de fabrication d'une dose de traitement (matières premières, main-d'œuvre, contrôle qualité, infrastructure GMP), par opposition à son prix de vente. Pour les thérapies cellulaires autologues (fabriquées à partir des propres cellules du patient, comme la majorité des CAR-T actuels), le COGS est structurellement élevé : chaque lot est unique, fabriqué à la demande pour un seul patient, ce qui empêche les économies d'échelle. À l'inverse, un modèle allogénique *off-the-shelf* comme celui retenu pour les ThTC (cf. 7.1) permet de produire un lot unique à grande échelle et de le distribuer à de nombreux patients, ce qui réduit mécaniquement le COGS par dose et rend le modèle économiquement plus soutenable à long terme.

8.2. Position du glioblastome

La stratégie commerciale des thérapies à cellules T (CAR-T) s'est historiquement concentrée sur les cancers hématologiques, pour deux raisons principales : d'une part, les cellules T peuvent circuler librement dans le sang et atteindre facilement leur cible (les cellules tumorales circulantes ou dans la moelle osseuse) ; d'autre part, ces cancers présentent des antigènes de surface relativement homogènes et bien caractérisés (comme CD19), facilitant la conception d'un récepteur chimérique unique et efficace pour une large population de patients.

Le glioblastome ne réunit aucune de ces deux conditions favorables. Premièrement, la barrière hémato-encéphalique empêche les cellules T administrées par voie systémique d'atteindre efficacement la tumeur, nécessitant une administration locale complexe (intracrânienne). Deuxièmement, le GBM présente une hétérogénéité antigénique intratumorale considérable : contrairement à un lymphome où un antigène unique cible la quasi-totalité des cellules malignes, deux tumeurs de GBM chez deux patients différents expriment des combinaisons d'antigènes très différentes, et une même tumeur contient souvent plusieurs sous-clones aux profils antigéniques distincts. Un CAR-T ciblant un seul antigène risque donc de laisser échapper une partie de la tumeur.

C'est précisément cette différence biologique qui justifie l'approche par cellules tumorales entières des ThTC plutôt qu'une approche CAR-T classique : en exploitant le répertoire antigénique complet de la tumeur (néoantigènes, antigènes de différenciation, marqueurs de cellules souches gliomateuses : cf. 3.1.2) et en délivrant le traitement directement dans la cavité de résection, les ThTC contournent à la fois le problème de la BHE et celui de l'hétérogénéité antigénique. Le marché du GBM représente donc une niche thérapeutique distincte de celle des cancers hématologiques, avec un besoin médical non couvert important (survie médiane historiquement limitée) mais des contraintes de développement propres, qui expliquent pourquoi peu d'acteurs industriels s'y sont positionnés jusqu'ici comparer au foisonnement de programmes CAR-T en hématologie.

8.3. Acteurs clés

Le paysage des acteurs impliqués dans le développement de nouvelles thérapies contre le glioblastome (GBM) s'articule autour de trois catégories complémentaires : les grands groupes pharmaceutiques, les sociétés de biotechnologie spécialisées et les équipes académiques.

Les grands groupes pharmaceutiques disposent des capacités financières, industrielles et réglementaires nécessaires pour conduire les essais cliniques de grande ampleur et assurer la mise sur le marché des nouvelles thérapeutiques. Historiquement, Roche s'est imposé comme un acteur majeur du GBM grâce au développement du bevacizumab (Avastin®), anticorps monoclonal anti-VEGF utilisé dans le traitement des glioblastomes récidivants dans plusieurs pays. D'autres groupes pharmaceutiques, tels que Merck & Co., Bristol Myers Squibb ou AstraZeneca, poursuivent le développement de stratégies d'immunothérapie et de thérapies ciblées, principalement en association avec les traitements standards ou d'autres approches innovantes. Bien que les résultats obtenus avec les inhibiteurs de points de contrôle immunitaire restent à ce jour limités dans le GBM, ces entreprises continuent d'investir dans ce domaine afin d'identifier des combinaisons thérapeutiques plus efficaces.

Les sociétés de biotechnologie constituent aujourd'hui le principal moteur de l'innovation de rupture dans le traitement du glioblastome. Elles développent des approches hautement spécialisées reposant sur les virus oncolytiques, les thérapies géniques, les vaccins thérapeutiques ou encore les cellules thérapeutiques. Parmi les acteurs les plus impliqués figurent DNAtrix, qui développe le virus oncolytique DNX-2401 (tasadenoturev), Candel Therapeutics, spécialisée dans les virus oncolytiques exprimant des gènes immunostimulants, Istari Oncology, qui développe le poliovirus recombinant PVSRIPO, ainsi que VBI Vaccines, engagée dans le développement de vaccins thérapeutiques ciblant les antigènes tumoraux. Ces entreprises s'appuient sur des levées de fonds, des partenariats industriels et des collaborations académiques afin d'accélérer le passage des innovations vers les essais cliniques.

Enfin, la recherche académique demeure le principal réservoir d'innovations à un stade précoce. Les universités, centres hospitalo-universitaires et instituts de recherche réalisent la majorité des travaux de preuve de concept, des études précliniques ainsi que des premiers essais cliniques de phase I/II. Ils sont également à l'origine de nombreux essais coopératifs multicentriques et de plateformes d'essais adaptatifs permettant d'évaluer simultanément plusieurs stratégies thérapeutiques. Une fois leur faisabilité et leur efficacité préliminaire démontrées, ces innovations sont généralement transférées vers des sociétés de biotechnologie ou des groupes pharmaceutiques capables d'assurer leur développement clinique avancé, leur production selon les normes GMP, les procédures réglementaires et leur commercialisation.

À ce stade de son développement, la plateforme ThTC s'inscrit pleinement dans ce modèle classique de valorisation académique. Actuellement au stade préclinique, elle devra franchir les étapes de validation réglementaire et clinique avant d'envisager un transfert industriel. Comme pour la majorité des innovations en oncologie, son développement vers une application clinique reposera vraisemblablement sur un partenariat avec un acteur industriel capable de financer les essais cliniques de phases avancées, d'assurer la fabrication à grande échelle

selon les normes GMP et d'accompagner les démarches réglementaires décrites dans les sections 7.1 et 7.2.

8.4. Modèle économique

Le choix d'un modèle allogénique *off-the-shelf* pour les ThTC (déjà justifié sur le plan de la fabrication en 7.1.1) a des implications économiques directes. Contrairement à un produit autologue facturé à l'unité pour chaque patient avec un COGS élevé, un produit off-the-shelf permet une production en grande série à partir d'une banque cellulaire unique, ce qui dilue les coûts fixes de fabrication GMP sur un plus grand nombre de doses et améliore la marge par patient traité, à condition que les volumes de patients justifient l'investissement initial en infrastructure.

Le modèle allogénique renverse cette logique. À partir d'une Master Cell Bank unique, des milliers de doses identiques sont produites en une seule campagne de fabrication, réduisant le COGS à 4 000–20 000 $ par dose. Les projections les plus récentes (GlobalRPH, 2026 ; Allogene Therapeutics) convergent vers une cible de prix inférieure à 30 000–50 000 $ par traitement, représentant une compression de 90 à 95 % par rapport aux thérapies autologues actuelles, avec une disponibilité immédiate en stock. (*Figure 30)*

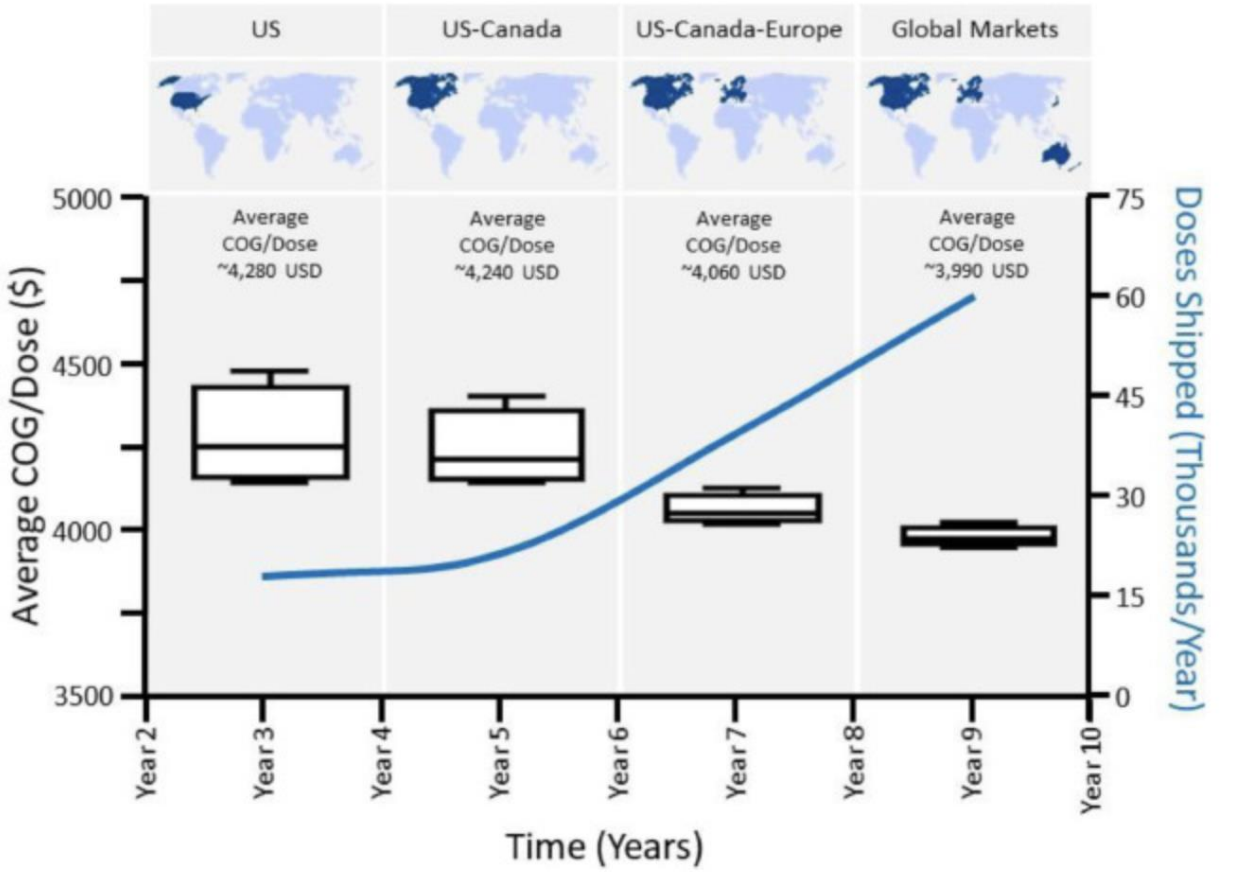


Figure 30 : *Impact de la production délocalisée sur le coût de fabrication des CAR-T, adapté de Harrison et al. 2019*

Ce modèle économique se décline différemment selon les zones géographiques. La région APAC (*Asia-Pacific*, Asie-Pacifique) est identifiée comme la zone de croissance la plus rapide du marché du GBM, avec un taux de croissance annuel composé (CAGR) élevé attendu d'ici 2030, porté par l'augmentation de l'incidence des tumeurs cérébrales diagnostiquées et par l'approbation facilitée de statuts de médicament orphelin dans certains pays de la région. Cette dynamique constitue une opportunité stratégique pour un produit off-the-shelf comme les ThTC, dont la logistique de distribution (lots cryopréservés, cf. 7.1.3) est mieux adaptée à une expansion internationale rapide qu'un modèle autologue nécessitant une infrastructure de fabrication locale dans chaque pays.

En Europe, le développement et la commercialisation d'un tel produit devront composer avec le cadre réglementaire de l'EMA (*European Medicines Agency*, Agence européenne des médicaments), l'autorité qui évalue et autorise la mise sur le marché des médicaments dont les ATMP (MTI) , dans l'Union européenne, via son comité spécialisé CAT déjà mentionné en 7.2.1.

Cette réduction n'est pas seulement une amélioration marginale : elle change la nature même de l'équation économique. À 30 000–50 000 $ par dose, une ThTC allogénique entre dans un segment de prix négociable avec les payeurs institutionnels : Haute Autorité de Santé (HAS)/ Comité Économique des Produits de Santé (CEPS) en France, CMS aux États-Unis, là où une thérapie à 500 000 $ par injection se heurte à des barrières d'accès quasi-insurmontables, indépendamment de son efficacité clinique. C'est précisément cette convergence entre faisabilité industrielle et acceptabilité médico-économique qui fait du modèle allogénique un prérequis stratégique pour tout déploiement à grande échelle dans le GBM.

La France dispose d'un dispositif d'accès précoce, piloté par la HAS, permet à des médicaments ou thérapies n'ayant pas encore obtenu d'AMM (ou dont l'AMM ne couvre pas encore l'indication visée) d'être utilisés et remboursés à titre exceptionnel, dès lors qu'ils répondent à quatre critères cumulatifs :

- Maladie grave, rare ou invalidante, le GBM, tumeur cérébrale primitive de grade IV avec une survie médiane inférieure à 15 mois sous standard of care, satisfait pleinement ce critère.
- Absence d'alternative thérapeutique appropriée, dans le contexte du GBM récidivant ou en progression après radiochimiothérapie de Stupp, aucun traitement n'offre de bénéfice de survie globale significatif, constituant un unmet medical need documenté.

- Présomption d'efficacité et de sécurité, fondée sur des données précliniques et cliniques préliminaires (phase I/II), évaluée par la HAS sur la base d'un dossier déposé par le laboratoire.
- Médicament en cours d'évaluation en vue d'une AMM, un engagement d'obtention d'une AMM dans des délais raisonnables est requis.

Durant la période d'accès précoce, le prix est librement fixé par le fabricant (indemnité d'accès précoce), et le remboursement est intégral par l'Assurance Maladie. À l'issue de l'obtention de l'AMM et de l'évaluation par la HAS (ASMR/SMR), une convention de prix est négociée avec le CEPS, et un mécanisme de remboursement différentiel peut s'appliquer si le prix définitif est inférieur au prix perçu durant l'accès précoce.
Pour une ThTC allogénique ciblant le GBM, ce dispositif constitue une voie d'accès au marché français potentiellement antérieure à l'AMM européenne de plusieurs années, permettant de générer des données en vie réelle et de construire un dossier médico-économique solide en amont de la négociation tarifaire définitive. C'est notamment le cas de plusieurs médicaments de thérapie innovante (MTI) tels que les CAR-T cells (par exemple Yescarta® ou Kymriah®), qui ont bénéficié en France d'un accès précoce avant l'obtention de leur AMM européenne définitive, avec constitution parallèle d'un registre de données de vie réelle (registre DESCAR-T) ayant nourri les négociations tarifaires ultérieures avec le Comité Économique des Produits de Santé (CEPS)**.** Une ThTC allogénique en phase de développement clinique avancé pourrait suivre une trajectoire réglementaire similaire.

En France, les thérapies innovantes onéreuses prescrites en milieu hospitalier peuvent être financées selon deux modalités distinctes :

- Le financement via la Liste en Sus (LES) : les médicaments inscrits sur cette liste sont remboursés par l'Assurance Maladie en sus des tarifs des Groupes Homogènes de Séjours (GHS), c'est-à-dire que le coût du médicament est pris en charge séparément du financement de l'hospitalisation. Cette liste est particulièrement pertinente pour les thérapies innovantes à prix élevé, médicaments de thérapie innovante (MTI), anticorps monoclonaux, thérapies ciblées, dont le coût excéderait la couverture budgétaire des GHS.
- Le Forfait Innovation : dispositif permettant le financement temporaire d'actes ou de produits à fort potentiel d'innovation non encore remboursables de droit commun, dans le cadre d'études cliniques ou de collecte de données. Ce mécanisme peut s'avérer pertinent pour des usages compassionnels ou des protocoles de collecte de données en vie réelle associés à une ThTC allogénique en phase de développement clinique avancé.

Au-delà du cadre français, la stratégie de mise sur le marché des ThTC bénéficiera des dispositifs d'accès précoce disponibles dans les principales zones géographiques cibles :

- États-Unis : FDA Breakthrough Therapy Designation (BTD) et Accelerated Approval : le statut Breakthrough Therapy, accordé sur la base de preuves préliminaires d'amélioration substantielle sur un endpoint cliniquement significatif, confère un accompagnement renforcé de la FDA et peut accélérer significativement le calendrier d'approbation. L'Accelerated Approval, fondé sur un surrogate endpoint raisonnablement susceptible de prédire le bénéfice clinique, permet une mise sur le marché avant la démonstration complète du bénéfice sur la survie globale avec obligation de confirmation post-approbation.

La combinaison de ces dispositifs, dans une stratégie de dépôts réglementaires coordonnés, permet d'envisager une mise sur le marché en accès précoce dans les principaux marchés occidentaux dès la fin de la phase II, avant même l'obtention d'une AMM complète générant ainsi des revenus anticipés tout en construisant la base de données cliniques nécessaire aux approbations définitives.

Ce cadre réglementaire et économique multi-niveaux, particulièrement favorable en France grâce aux dispositifs d'accès précoce, d'accès direct et de financement hors-GHS, constitue un levier stratégique majeur pour la commercialisation des ThTC allogéniques dans le GBM, permettant de monétiser la valeur thérapeutique de la plateforme dès les phases cliniques avancées tout en alimentant les dossiers de remboursement définitif dans chaque juridiction.

IX.Discussion et Conclusion

9.1. Apports scientifiques du travail

La contribution scientifique centrale de ce travail réside dans le renversement paradigmatique qu'il propose face à une impasse thérapeutique de deux décennies : plutôt que de concevoir les cellules tumorales comme des cibles à détruire ou des obstacles à contourner, la plateforme ThTC les repositionne comme des agents thérapeutiques actifs exploitant leurs propriétés biologiques intrinsèques : tropisme tumoral, plasticité épigénétique, richesse antigénique au service d'une réponse immunitaire anti-tumorale coordonnée [4,43]. Ce renversement n'est pas seulement rhétorique : il a des implications mécanistiques concrètes qui expliquent pourquoi la plateforme ThTC adresse simultanément des obstacles que toutes les stratégies précédentes ont abordés séquentiellement et sans succès.
En développant une plateforme multifonctionnelle intégrant cytotoxicité directe, immunostimulation active, remodelage du microenvironnement et induction de mémoire immunitaire dans une architecture cellulaire vivante dotée d'un tropisme tumoral intrinsèque, ce travail propose la première stratégie immunothérapeutique du GBM dont la conception répond simultanément aux quatre déterminants biologiques de l'échec thérapeutique identifiés en introduction [43].

Sur le plan méthodologique, ce travail illustre la puissance de l'édition génomique CRISPR-Cas9 comme outil d'ingénierie cellulaire précise et polyvalente permettant de résoudre des problèmes biologiques qui avaient jusqu'ici rendu inutilisables des payloads thérapeutiques potentiellement puissants [45]. L'invalidation ciblée d'IFNAR1 résolvant l'autocytotoxicité qui aurait rendu biologiquement incohérente l'utilisation de l'IFNβ dans des cellules vivantes illustre comment l'édition génomique permet de découpler des propriétés biologiques naturellement couplées pour créer des configurations cellulaires impossibles à obtenir par des approches de

modification cellulaire antérieures [45]. Cette approche méthodologique est exportable à d'autres plateformes de thérapie cellulaire confrontées à des problèmes similaires d'autocytotoxicité ou d'interactions biologiques non souhaitées entre payload et cellule vectrice.

9.2.Limites

La principale limite de la plateforme ThTC, et l'obstacle le plus difficile à lever avant la translation clinique, est l'incertitude irréductible sur la sécurité à long terme des cellules tumorales vivantes génétiquement modifiées administrées dans le parenchyme cérébral humain. Malgré la robustesse des systèmes de sécurité redondants, la probabilité non nulle d'un échappement génétique aux kill switches combinée aux conséquences catastrophiques que représenterait le développement d'une tumeur iatrogène dans un contexte déjà neurochirurgical impose une exigence de preuve de sécurité d'un niveau sans précédent dans le champ des MTI. Les études réglementaires de pharmacologie de sécurité (genotoxicité, oncogénicité, biodistribution) dans les modèles les plus permissifs disponibles (souris immunodéficientes NSG, primates non humains) constitueront le test de vérité de la sécurité préclinique, mais ne pourront pas lever toutes les incertitudes sur les événements rares à fréquence inférieure au seuil de détection des études animales.

Le fossé préclinique-clinique illustré de manière répétée dans l'histoire de l'immunothérapie du GBM, où de nombreuses approches ayant démontré une efficacité remarquable dans les modèles murins ont échoué en essais cliniques constitue une limite structurelle que la plateforme ThTC ne peut prétendre avoir résolue à ce stade de son développement. Les modèles murins syngéniques, malgré leur pertinence pour l'évaluation des mécanismes immunologiques fondamentaux, ne reproduisent pas fidèlement la profondeur de l'immunosuppression du TME humain, la complexité du microenvironnement cérébral humain, ni les interactions pharmacocinétiques propres à la biologie humaine. La translation des données précliniques en efficacité clinique reste donc une hypothèse à valider, et la probabilité d'échec partiel ou total en phase clinique doit être honnêtement reconnue comme inhérente au stade actuel de développement.

La profonde hétérogénéité biologique inter-patient du GBM en termes de charge mutationnelle, de profil d'expression antigénique, d'intensité de l'immunosuppression du TME et de fond génétique immunologique rend improbable une efficacité homogène de la plateforme ThTC dans l'ensemble de la population GBM. Certains patients, dont les tumeurs présentent un TME particulièrement pauvre en précurseurs dendritiques ou une déplétion lymphocytaire systémique sévère liée à la corticothérapie prolongée, pourraient ne pas bénéficier des mécanismes immunologiques sur lesquels repose l'efficacité des ThTC. L'identification prospective de ces « non-répondeurs biologiques » par des biomarqueurs prédictifs validés constitue un défi méthodologique majeur dont la résolution conditionne la pertinence clinique réelle de la plateforme. De plus le modèle allogénique pourrait engendrer un rejet des cellules tumorales qui constitue

l'effet indésirable majeur car provenant d'autres patients et ne pourraient convenir aux besoins du patient attendant l'injection.

9.3.Comparaison avec approches existantes

Par rapport aux CAR-T, la plateforme ThTC présente des avantages structurels directs sur les deux obstacles principaux qui condamnent les CAR-T dans le GBM. L'échappement antigénique : mécanisme d'échec central des CAR-T mono-cibles ciblant EGFRvIII ou IL13Rα2 [32] [36] est adressé par la nature polyclonale de la réponse T induite par les ThTC, qui cible simultanément l'intéralité du répertoire antigénique tumoral sans pression sélective exercée sur un antigène unique. L'épuisement fonctionnel dans le TME immunosuppresseur, deuxième obstacle des CAR-T dans le GBM [42], est atténué par le remodelage actif du microenvironnement opéré par les ThTC, qui convertissent le milieu hostile en environnement permissif à la persistance fonctionnelle des effecteurs cytotoxiques. Cette limitation a été observée de manière convaincante dans l'essai clinique INCIPIENT (NCT04003649)[69], étude de phase I/II évaluant les CAR-T ciblant EGFRvIII dans le GBM récurrent, montrant une réponse clinique limitée malgré un taux d'infiltration tumorale élevé, confirmant que l'épuisement fonctionnel dans le microenvironnement immunosuppresseur demeure un obstacle majeur. Les ThTC et les CAR-T ne sont cependant pas des alternatives mutuellement exclusives : comme développé au chapitre II, les ThTC peuvent être envisagées comme une plateforme de conditionnement immunologique préalable à l'administration de CAR-T, préparant un microenvironnement favorable à leur infiltration et leur persistance [13]. *(Figure 31)*

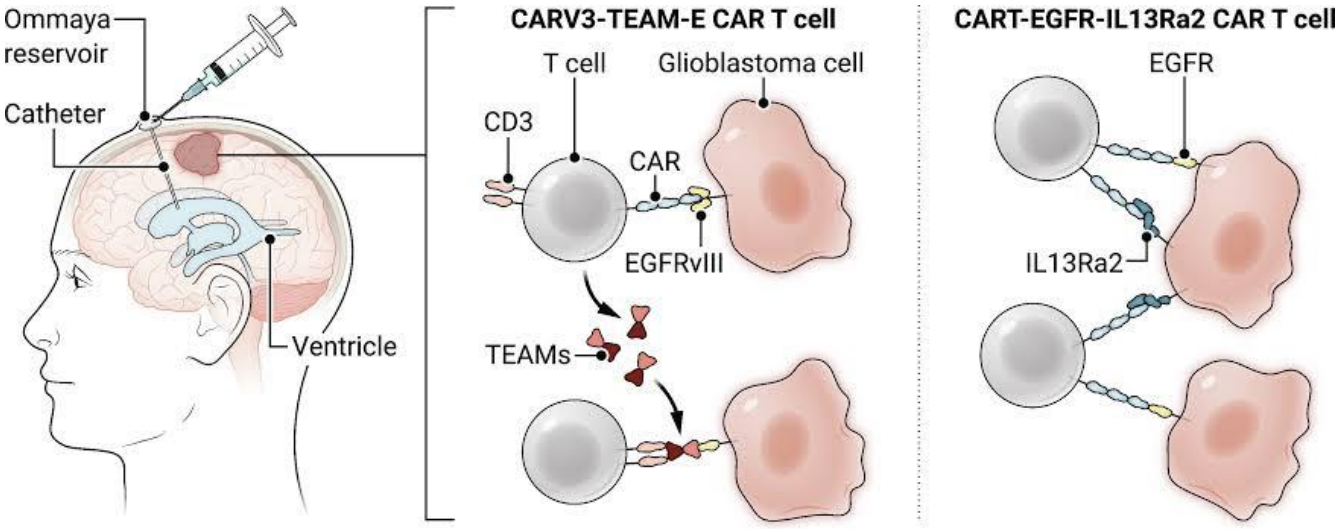


Figure 31: *Thérapies CAR-T de nouvelle génération pour le glioblastome, adapté de Bernstock JD. et al. 2024*[68]

Les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) représentent une plateforme cellulaire distincte dont le potentiel thérapeutique dans le GBM repose sur une propriété fondamentale absente des autres approches immunothérapeutiques : leur capacité de différenciation dirigée en

types cellulaires adaptés au microenvironnement tumoral cérébral. En particulier, la différenciation des iPSC en macrophages dérivés de cellules souches dits macrophages iPSC ou iMac offre une voie d'accès au compartiment myéloïde intracerebral que ni les ICI (Immune Checkpoint Inhibitor : inhibiteurs de points de contrôle immunitaire) ni les CAR-T ne peuvent atteindre efficacement. Ces iMac présentent un profil fonctionnel reprogrammable vers un phénotype M1 pro-inflammatoire, capable de contrecarrer la polarisation M2 immunosuppressive des macrophages associés à la tumeur (TAM) qui constituent l'un des piliers structurels de l'immunosuppression dans le GBM. Contrairement aux monocytes circulants dont l'infiltration cérébrale est limitée par la barrière hémato-encéphalique, les iPSC différenciées in situ ou administrées par voie intratumorale peuvent coloniser le microenvironnement tumoral et exercer une pression myéloïde soutenue. La complémentarité avec la plateforme ThTC est directe : les ThTC opèrent une reprogrammation lymphocytaire T du microenvironnement, tandis que les iMac dérivés d'iPSC ciblent le compartiment myéloïde, les deux approches agissant de manière synergique sur les deux axes cellulaires dominants de l'immunosuppression dans le GBM. *(Figure 32)*

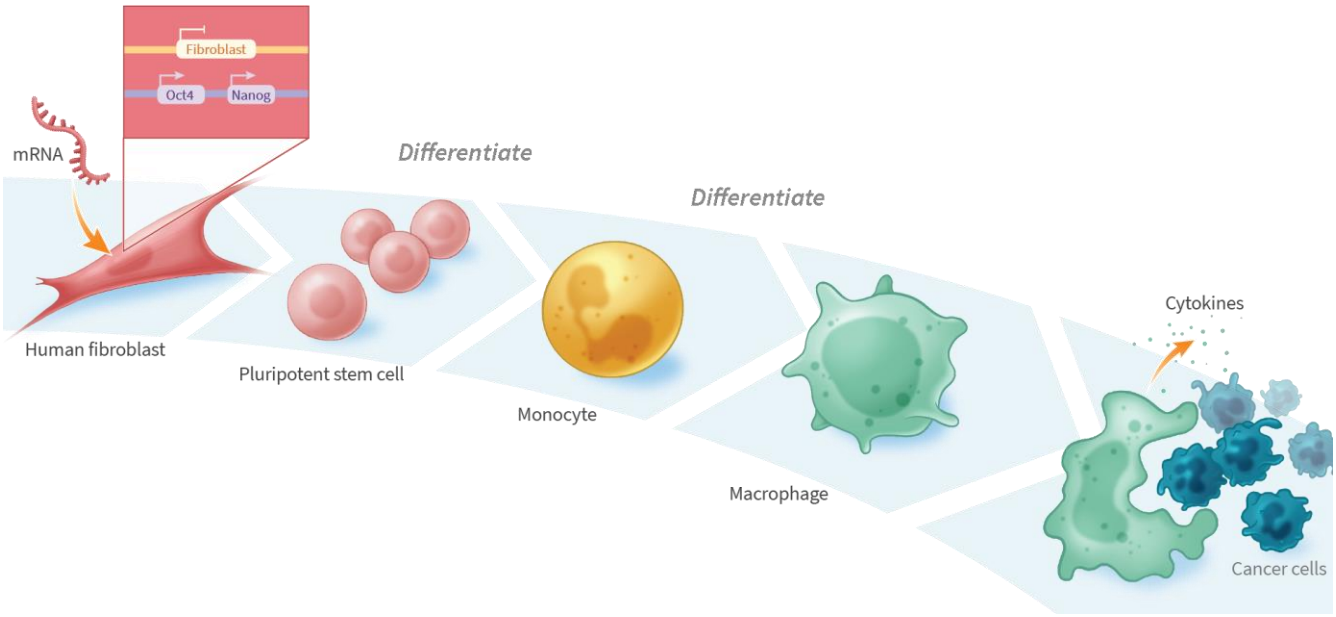


Figure 32 : *Macrophages M1/M2 dérivés de monocytes iPSC et activité anti-tumorale, adapté de Hay I. et al. 2022.*

Les virus oncolytiques (OV), notamment le poliovirus modifié PVSRIPO (Duke University), le réovirus (Reolysin), et l'herpèsvirus oncolytique G47Δ approuvé au Japon pour le GBM, partagent avec les ThTC l'objectif de conversion de la tumeur froide en tumeur immunogène, mais par des mécanismes distincts. Les OV induisent une mort cellulaire immunogène virale par lyse des cellules infectées, libèrent des PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) activant les DC résidentes, et peuvent exprimer des transgènes immunomodulateurs (GM-CSF, IL-12) à la manière des ThTC. Leurs limitations propres : neutralisation par les anticorps antiviraux préexistants, difficulté d'infection des cellules tumorales à BHE intacte, variabilité du tropisme

viral les distinguent de la plateforme ThTC dont le tropisme repose sur un mécanisme biologique cellulaire autonome non susceptible de neutralisation humorale. Ces deux approches sont en outre complémentaires et leur combinaison OV induisant une mort immunogène initiale massive, ThTC maintenant et amplifiant le signal immunostimulateur dans le temps constitue une perspective de développement de quatrième génération méritant une évaluation préclinique dédiée. *(Figure 33)*

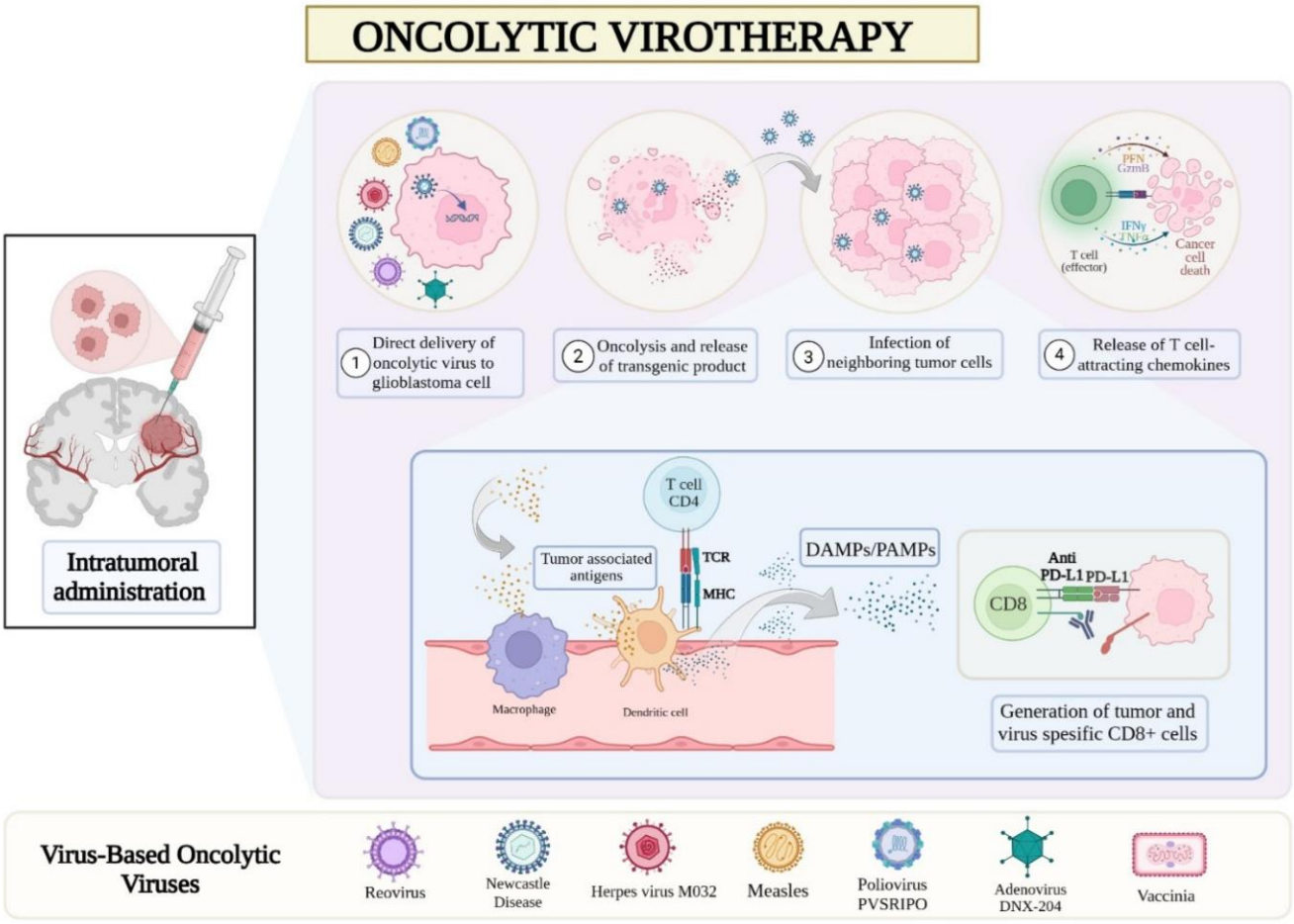


Figure 33 : *Virus oncolytiques dans le traitement du glioblastome, adapté de Alomari O. et al. 2025*

9.4.Perspectives futures

Plusieurs axes d'amélioration biologique restent à explorer pour renforcer l'efficacité et la sécurité des ThTC avant leur passage en clinique. L'ajout de molécules immunomodulatrices supplémentaires au tandem IFNβ/GM-CSF pourrait être envisagé pour cibler des mécanismes immunosuppresseurs non encore adressés par la plateforme actuelle notamment l'axe des points de contrôle immunitaire (PD-1/PD-L1, CTLA-4), dont l'expression reste élevée dans le microenvironnement du GBM malgré le remodelage induit par les ThTC (cf. 5.4.3). Une combinaison des ThTC avec des inhibiteurs de checkpoint, administrés localement ou systémiquement, pourrait ainsi lever un frein immunitaire résiduel non couvert par le mécanisme actuel.

L'expérience de rechallenge décrite en 5.4.2, bien que prometteuse, reste à ce stade limité à un seul modèle tumoral (CT2A ou GL261) et à un nombre restreint d'animaux. Une caractérisation plus fine de la mémoire immunitaire générée, par exemple via l'identification des clones lymphocytaires T impliqués, ou la durée exacte de cette protection au-delà de 60 jours , permettrait de mieux anticiper la durabilité du bénéfice clinique attendu chez l'homme.

Les trois systèmes de kill switch orthogonaux décrits en 6.2 (HSV-TK/GCV, iCasp9, iRIPK3) constituent une base solide, mais leur intégration simultanée au sein d'une même cellule soulève des questions encore ouvertes : charge génétique cumulée acceptable pour la cellule modifiée, risque d'interférence entre les différents transgènes, et stabilité de l'expression de chacun des trois systèmes sur la durée de vie de la banque cellulaire. Des travaux futurs devront caractériser précisément la cinétique d'activation combinée de ces trois systèmes, et déterminer si leur activation séquentielle ou simultanée optimise le rapport entre sécurité et effet immunogène bénéfique de la nécroptose (cf. 6.2.4).

Le principe biologique fondateur des ThTC, exploiter la plasticité, le tropisme et la richesse antigénique des cellules tumorales elles-mêmes plutôt que de les combattre (cf. 3.1) n'est pas restreint au glioblastome. D'autres tumeurs solides à fort tropisme intrinsèque documenté et à forte hétérogénéité antigénique (par exemple certains cancers du pancréas ou du poumon) pourraient représenter des indications futures pertinentes pour la plateforme, à condition d'identifier des lignées fondatrices adaptées à chaque contexte tumoral et de valider le tropisme spécifique de ces cellules vers leur site d'origine.

Sur le plan réglementaire, l'étape suivante consiste à finaliser le dossier IND (cf. 7.1.1 et 7.2), en s'appuyant sur les données de sécurité et d'efficacité précliniques déjà générées. La conception d'un essai de phase I chez l'homme (cf. 7.3.1) devra en particulier déterminer si l'escalade de dose doit privilégier le nombre de cellules administrées, la fréquence d'administration, ou une combinaison des deux, une question restée ouverte dans les données précliniques disponibles à ce jour. La mise en place d'un suivi longitudinal des biomarqueurs immunitaires périphériques, en parallèle du suivi de sécurité obligatoire pour les ATMP (cf. 7.2.2), permettra de corréler pour la première fois chez l'homme les mécanismes immunologiques déjà caractérisés en modèle murin (recrutement des DC, polarisation macrophagique M1, réduction de l'épuisement lymphocytaire T) avec la réponse clinique observée.

À plus long terme, la plateforme ThTC pourrait s'inscrire dans une logique de stratification des patients fondée sur les caractéristiques moléculaires individuelles de leur tumeur (statut IDH, méthylation MGMT, profil transcriptomique du microenvironnement immunitaire), permettant d'identifier a priori les sous-populations de patients les plus susceptibles de bénéficier du traitement, et d'orienter le développement clinique vers ces populations en priorité, une approche cohérente avec la tendance générale de l'oncologie de précision, tout en conservant l'avantage d'un produit off-the-shelf non personnalisé au niveau de la fabrication (cf. 7.1, 7.4.4).

X.Conclusion générale

Le glioblastome demeure, en 2026, l'un des défis thérapeutiques les plus redoutables de l'oncologie moderne. Deux décennies d'efforts intenses : optimisation de la chimioradiothérapie, développement de thérapies ciblées, essais de multiples immunothérapies n'ont pas réussi à modifier substantiellement un pronostic qui reste fondamentalement identique à celui de 2005, date de publication du protocole de Stupp [20]. Ce constat d'échec collectif n'est pas le témoignage d'une insuffisance de la recherche, mais le reflet d'obstacles biologiques d'une profondeur et d'une complexité que les paradigmes thérapeutiques conventionnels sont structurellement incapables de surmonter.
Ce travail propose une réponse à cette impasse par un renversement paradigmatique : transformer les cellules tumorales elles-mêmes ; instruments de la maladie en agents thérapeutiques actifs contre leur propre pathologie. Les cellules tumorales thérapeutiques (ThTC), résultat d'une reprogrammation génétique ciblée par édition CRISPR-Cas9, convertissent les propriétés biologiques qui rendent le GBM redoutable, son tropisme invasif, sa plasticité épigénétique, la richesse de son répertoire antigénique en leviers thérapeutiques exploitables. En sécrétant de manière constitutive de l'IFNβ et du GM-CSF dans le microenvironnement tumoral qu'elles infiltrent naturellement, les ThTC exercent simultanément une cytotoxicité croisée sur les cellules tumorales voisines, recrutent et maturent les cellules dendritiques, repolarisent les macrophages immunosuppresseurs, et initient une réponse T adaptative polyclonale dont la mémoire immunologique perdure bien au-delà de leur propre durée de vie [45].

La validation préclinique de ce concept dans cinq modèles murins syngéniques distincts , éradication tumorale dans 60 à 80 % des animaux traités, établissement d'une mémoire immunitaire polyclonale durable, protection complète au rechallenge tumoral dans plus de 85 % des longs survivants [45] fournit un ensemble de preuves de concept dont la robustesse cross-modèle et la cohérence mécanistique justifient la progression vers les études réglementaires de sécurité et les essais cliniques de phase I. Le développement d'une formulation allogénique off-the-shelf standardisée, fabriquée à partir de lignées cellulaires caractérisées dans des conditions GMP reproducibles, adresse les contraintes logistiques et économiques qui ont condamné les approches autologues précédentes à une inaccessibilité structurelle [47].

Les systèmes de sécurité redondants et orthogonaux intégrés dans la plateforme HSV-TK/ganciclovir, iCasp9, iRIPK3 répondent aux exigences réglementaires d'un produit de thérapie avancée utilisant des cellules vivantes modifiées, tout en ajoutant une dimension immunologique à leur fonction de sécurité : la nécroptose immunogène induite par iRIPK3 transforme l'élimination contrôlée des ThTC en booster immunologique terminal, alignant sécurité et efficacité dans une architecture cohérente [48,49].

Les perspectives de la plateforme ThTC dépassent le seul glioblastome. Les principes biologiques sur lesquels elle repose sont applicables, avec les adaptations nécessaires, à d'autres tumeurs solides caractérisées par une immunosuppression profonde du TME et une résistance aux immunothérapies conventionnelles : cancer du pancréas, cancer de l'ovaire, mésothéliome pleural. La plateforme ThTC n'est pas une solution spécifique à un cancer particulier : elle est un cadre conceptuel et technologique dont le GBM constitue le premier terrain d'application, en raison de l'intensité du besoin médical non satisfait et de la convergence de propriétés biologiques favorables à l'exploitation thérapeutique des cellules tumorales comme vecteurs immunomodulateurs.

En définitive, ce travail propose que le cancer dans sa complexité biologique même contient les outils nécessaires à son propre contrôle. En retournant contre le GBM ses propres armes biologiques, la plateforme ThTC ouvre une voie thérapeutique dont le potentiel clinique, s'il est confirmé par les essais en cours de conception, pourrait transformer fondamentalement la prise en charge d'une maladie qui a résisté à toutes les tentatives précédentes.

XII.Références

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, Jemal A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2024;74(3):229-263. doi:10.3322/caac.21834

2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018;68(6):394-424. doi:10.3322/caac.21492

3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013

4. Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions. Cancer Discov. 2022;12(1):31-46. doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059

5. Wild CP, Weiderpass E, Stewart BW, eds. World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2020. ISBN 978-92-832-0447-3

6. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. Nature. 2006;444(7120):756-760

7.Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. Nat Rev Cancer. 2013

8. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, Eklund AC, Spencer-Dene B, Clark G, Pickering L, Stamp G, Gore M, Szallasi Z, Downward J, Futreal PA, Swanton C. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. N Engl J Med. 2012;366(10):883-892

9. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbé C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urba WJ. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. N Engl J Med. 2010;363(8):711-723

10. Herbst RS, Baas P, Kim DW, Felip E, Pérez-Gracia JL, Han JY, Molina J, Kim JH, Arvis CD, Ahn MJ, Majem M, Fidler MJ, de Castro G Jr, Garrido M, Lubiniecki GM, Shentu Y, Im E, Dolled-Filhart M, Garon EB. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. Lancet. 2016;387(10027):1540-1550

11. Galon J, Bruni D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. Nat Rev Drug Discov. 2019;18(3):197-218

12. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, Bader P, Verneris MR, Stefanski HE, Myers GD, Qayed M, De Moerloose B, Hiramatsu H, Schlis K, Davis KL, Martin PL, Nemecek ER, Yanik GA, Peters C, Baruchel A, Boissel N, Mechinaud F, Balduzzi A, Krueger J, June CH, Levine BL, Wood P, Taran T,

Leung M, Mueller KT, Zhang Y, Sen K, Lebwohl D, Pulsipher MA, Grupp SA. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia. N Engl J Med. 2018;378(5):439-448

13. Martinez M, Moon EK. CAR T cells for solid tumors: new strategies for finding, infiltrating, and surviving in the tumor microenvironment. Front Immunol. 2019;10:128

14. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, Hawkins C, Ng HK, Pfister SM, Reifenberger G, Soffietti R, von Deimling A, Ellison DW. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Neuro Oncol. 2021;23(8):1231-1251

15. Ostrom QT, Price M, Neff C, Cioffi G, Waite KA, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2015-2019. Neuro Oncol. 2022;24(Suppl 5):v1-v95

16. Gimple RC, Bhargava S, Dixit D, Rich JN. Glioblastoma stem cells: lessons from the tumor hierarchy in a lethal cancer. Genes Dev. 2019;33(11-12):591-609

17. Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert EE, Valentim CL, Rich JN. Cancer stem cells in glioblastoma. Genes Dev. 2015;29(12):1203-1217

18. Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H, Cahill DP, Nahed BV, Curry WT, Martuza RL, Louis DN, Rozenblatt-Rosen O, Suvà ML, Regev A, Bernstein BE. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. Science. 2014;344(6190):1396-1401.

19. Claes A, Idema AJ, Wesseling P. Diffuse glioma growth: a guerrilla war. Acta Neuropathol. 2007;114(5):443-458

20. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. N Engl J Med. 2005;352(10):987-996

21. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. N Engl J Med. 2005;352(10):997-1003. doi:10.1056/NEJMoa043331

22. Wen & Kesari, NEJM, 2008

23. Reardon DA, Brandes AA, Omuro A, Mulholland P, Lim M, Wick A, Baehring J, Ahluwalia MS, Roth P, Bähr O, De Greve J, Kumthekar P, Manns M, Strauss UP, Nuyens S, Hosein F, Cloughesy T. Effect of nivolumab vs bevacizumab in patients with recurrent glioblastoma: the CheckMate 143 phase 3 randomized clinical trial. JAMA Oncol. 2020;6(7):1003-1010

24. Lim M, Weller M, Idbaih A, Steinbach J, Finocchiaro G, Raval RR, Ansstas G, Baehring J, Taylor JW, Honnorat J, Sanson M, Wick A, Simes J, Vogelbaum MA, Lhermitte B, Manzo A, Neyns B, Jha MK, Simonetta F, Stupp R. Phase III trial of chemoradiotherapy with temozolomide plus nivolumab or placebo for newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter. Neuro Oncol. 2022;24(11):1935-1949

25. Weller M, Butowski N, Tran DD, Recht LD, Lim M, Hirte H, Ashby L, Mechtler L, Goldlust SA, Iwamoto F, Drappatz J, O'Rourke DM, Wong M, Hamilton MG, Finocchiaro G, Perry J, Wick W, Green J, He Y, Turner CD, Yellin MJ, Keler T, Davis TA, Stupp R, Sampson JH; ACT IV trial investigators. Rindopepimut with temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII-expressing glioblastoma (ACT IV): a randomised, double-blind, international phase 3 trial. Lancet Oncol. 2017;18(10):1373-1385

26. Daneman R, Prat A. The blood-brain barrier. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2015;7(1):a020412

27. Pardridge WM. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. NeuroRx. 2005;2(1):3-14

28. Liebner S, Dijkhuizen RM, Reiss Y, Plate KH, Agalliu D, Constantin G. Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease. Acta Neuropathol. 2018;135(3):311-336

29. Brown CE, Alizadeh D, Starr R, Weng L, Wagner JR, Naranjo A, Ostberg JR, Blanchard MS, Kilpatrick J, Simpson J, Kurien A, Priceman SJ, Wang X, Harshbarger TL, D'Apuzzo M, Ressler JA, Jensen MC, Barish ME, Chen M, Portnow J, Forman SJ, Badie B. Regression of glioblastoma after chimeric antigen receptor T-cell therapy. N Engl J Med. 2016;375(26):2561-2569

30. Bhowmik A, Khan R, Ghosh MK. Blood brain barrier: a challenge for effectual therapy of brain tumors. Biomed Res Int. 2015;2015:320941

31. van Tellingen O, Yetkin-Arik B, de Gooijer MC, Wesseling P, Wurdinger T, de Vries HE. Overcoming the blood-brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment. Drug Resist Updat. 2015;19:1-12

32. Jain RK, di Tomaso E, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG, Batchelor TT. Angiogenesis in brain tumours. Nat Rev Neurosci. 2007;8(8):610-622

33. Quail DF, Joyce JA. The microenvironmental landscape of brain tumors. Cancer Cell. 2017;31(3):326-341

34. Hambardzumyan D, Gutmann DH, Kettenmann H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. Nat Neurosci. 2016;19(1):20-27

35. Pombo Antunes AR, Scheyltjens I, Duerinck J, Neyns B, Movahedi K, Van Ginderachter JA. Understanding the glioblastoma immune microenvironment as basis for the development of new immunotherapeutic strategies. Elife. 2020 Feb 4;9:e52176.

36. Hato L, Vizcay A, Eguren I, Pérez-Gracia JL, Rodríguez J, Gállego Pérez-Larraya J, Sarobe P, Inogés S, Díaz de Cerio AL, Santisteban M. Dendritic Cells in Cancer Immunology and Immunotherapy. Cancers (Basel). 2024 Feb 28;16(5):981

37. Kmiecik J, Poli A, Brons NH, Waha A, Eide GE, Enger PØ, Zimmer J, Chekenya M. Elevated CD3+ and CD8+ tumor-infiltrating immune cells confer improved prognosis in World Health Organization grade II and III gliomas. Neuro Oncol. 2013;15(10):1338-1350

38. Crane CA, Austgen K, Haberthur K, Hofmann C, Landesberg GP. Immune evasion mediated by tumor-derived lactate dehydrogenase induction of NKG2D ligands on myeloid cells in glioblastoma patients. Proc Natl Acad Sci USA. 2014;111(35):12823-12828

39. Nduom EK, Wei J, Yaghi NK, Huang N, Kong LY, Gabrusiewicz K, Ling X, Zhou S, Ivan C, Chen JQ, Fuller GN, Calin GA, Conrad CA, Wainwright DA. PD-L1 expression and prognostic impact in glioblastoma. Neuro Oncol. 2016

40. Wainwright DA, Chang AL, Dey M, Heimberger AB, Kim CK. Durable therapeutic efficacy utilizing combinatorial blockade against IDO, CTLA-4, and PD-L1 in mice with brain tumors. Clin Cancer Res. 2014;20(20):5290-5301

41. Crane CA, Ahn BJ, Han SJ, Parsa AT. Soluble factors secreted by glioblastoma cell lines facilitate recruitment, survival, and expansion of regulatory T cells: implications for immunotherapy. Neuro Oncol. 2012;14(5):584-595

42. Alexandrov LB et al. Signatures of mutational processes in human cancer. Nature. 2013;500(7463):415-421

43. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. Nature. 2017;541(7637):321-330

44. Jonasch E, Haluska FG. Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. Oncologist. 2001

45. Chen KS, Lin LY, Chen YC, Shah K. Repurposing Tumor Cells: A Paradigm Shift in Cell-Based Therapies for Cancer. Clin Cancer Res. 2026 Feb 20:10.1158/1078-0432.CCR-25-3438

46. Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K, Jackson V, Hamada H, Pardoll D, Mulligan RC. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. Proc Natl Acad Sci USA. 1993;90(8):3539-3543

47. Alkayyal AA, Mahmoud AB. A 5-year update on the clinical development of cancer cell-based vaccines for glioblastoma multiforme. Pharmaceuticals. 2025

48. Diaconu I, Ballard B, Zhang M, Chen Y, West J. Inducible caspase-9 selectively modulates the toxicities of CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells. Mol Ther. 2017;25(3):580-592

49. Galluzzi L, Vitale I, Warren S, Adjemian S, Agostinis P, Martinez AB, Chan TA. Consensus guidelines for the definition, detection and interpretation of immunogenic cell death. J Immunother Cancer. 2020;8(1):e000337

50. van Elsas A, Hurwitz AA, Allison JP. Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. J Exp Med.

51. McKinnon C et al., Glioblastoma: clinical presentation, diagnosis, and management, BMJ, 2021

52. Shukla et al., Chin Clin Oncol, 2017

53.Kisby T, Borst GR, Coope DJ, Kostarelos K. Targeting the glioblastoma resection margin with locoregional nanotechnologies.Nature Reviews Materials

54. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. 2006;126(4):663-676

55. Chen KS, Reinshagen C, Van Schaik TA, Rossignoli F, Borges P, Mendonca NC, Abdi R, Simon B, Reardon DA, Wakimoto H, Shah K. Bifunctional cancer cell-based vaccine concomitantly drives direct tumor killing and antitumor immunity. Sci Transl Med. 2023 Jan 4;15(677):eabo4778

56.Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. Am J Med Sci. 1893;105(5):487-511

57. Bystryn JC, Oratz R, Roses D, Harris MN, Henn M, Lew R. Relationship between immune response to melanoma vaccine immunization and clinical outcome in stage II malignant melanoma. Cancer. 1992;69(5):1157-1164

58. Guo C, Manjili MH, Subjeck JR, Sarkar D, Fisher PB, Wang XY. Therapeutic cancer vaccines: past, present, and future. Adv Cancer Res. 2013;119:421-475

59. Schultz N, Oratz R, Chen D, Zeleniuch-Jacquotte A, Abeles G, Bystryn JC. Effect of DETOX as an adjuvant for melanoma vaccine. Vaccine. 1995

60. Morton DL, Eilber FR, Holmes EC, Hunt JS, Ketcham AS, Silverstein MJ, Sparks FC. BCG immunotherapy of malignant melanoma: summary of a seven-year experience. Ann Surg. 1974;180(4):635-643

61. Eggermont AM, Suciu S, Rutkowski P, Marsden J, Testori A, Corrie P, Couture J, Storecheggini M, Spatz A, Kruit WH. Adjuvant ganglioside GM2-KLH/QS-21 vaccination versus observation after resection of primary tumor > 1.5 mm in patients with stage II melanoma: results of the EORTC 18961 randomized phase III trial. J Clin Oncol.

62. Tsugawa T, Kuwashima N, Sato H, Fellows-Mayle WK, Dusak JE. Sequential delivery of interferon-alpha and the recruitment of resident microglia for tumor suppression in glioma. Cancer Immunol Immunother. 2004;53(4):204-213

63. Wheeler CJ, Das A, Liu G, Yu JS, Black KL. Clinical responsiveness of glioblastoma multiforme to chemotherapy after vaccination. Clin Cancer Res. 2004;10(16):5316-5326

64. Lutz ER, Wu AA, Bigelow E, Sharma R, Mo G, Karikari IO, Zheng L. Immunotherapy converts nonimmunogenic pancreatic tumors into immunogenic foci of immune regulation. Cancer Immunol Res. 2014;2(7):616-631

65.Okada H, Lieberman FS, Walter KA, Lunsford LD, Kondziolka DS, Bejjani GK, Hamilton RL, Torres-Trejo A et al,. Autologous glioma cell vaccine admixed with interleukin-4 gene transfected fibroblasts in the treatment of patients with malignant gliomas. J Transl Med. 2007 Dec 19;5:67

66. Chen K-S, Shah K. *Beyond safety: suicide systems in cell-based cancer therapies*. Trends in Cancer. 2025

67.ATTUNE: A Study to Evaluate the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of Intrathecally-Administered ION440 in Participants With MECP2 Duplication Syndrome (MDS). NCT06430385

68. Bernstock JD,. *Next-generation CAR T cell therapies for glioblastoma*. Science Translational Medicine. *2024*

69*.* Choi BD, Gerstner ER, Frigault MJ, Leick MB, Mount CW, Balaj L, et al. Intraventricular CARv3-TEAM-E T Cells in Recurrent Glioblastoma. *N Engl J Med.* 2024;390(14):1290-1298. doi:10.1056/NEJMoa2314390

Université de Lille -UFR3S-Pharmacie
DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE PHARMACIE HOSPITALIERE
Année Universitaire 2025/2026

Nom : CHAIBI
Prénom : Ibrahim

Titre de la thèse : Ingénierie des cellules tumorales comme stratégie thérapeutique : développement d'un vaccin cellulaire "off-the-shelf" pour le glioblastome et perspectives translationnelles

Mots-clés : Glioblastome , Thérapie cellulaire , Cellules tumorales thérapeutiques (ThTC), Microenvironnement tumoral, Édition génomique CRISPR-Cas9, Vaccin allogénique off-the-shelf , Systèmes de sécurité (kill switch), Barrière hémato-encéphalique

Résumé : Le glioblastome (GBM) est la tumeur cérébrale primitive la plus fréquente et la plus agressive chez l'adulte, avec une survie médiane de 14 à 18 mois malgré le traitement de référence (protocole de Stupp : chirurgie, radiothérapie, témozolomide). Son pronostic sombre s'explique par des obstacles biologiques majeurs rendant toute résection complète illusoire, et un microenvironnement immunosuppresseur qui fait du GBM une tumeur « froide », réfractaire aux immunothérapies classiques. À cela s'ajoute la barrière hémato-encéphalique, qui empêche la plupart des traitements d'atteindre la tumeur. Face à cet échec thérapeutique persistant depuis deux décennies, la thèse propose un renversement de paradigme : au lieu de combattre les cellules tumorales, les transformer en agents thérapeutiques. C'est le concept des ThTC (Therapeutic Tumor Cells) : des cellules de glioblastome génétiquement modifiées par CRISPR-Cas9 pour sécréter de l'IFNβ et du GM-CSF, tout en exploitant leur tropisme naturel pour cibler les zones résiduelles après chirurgie. Ces cellules intègrent aussi des systèmes de sécurité permettant de les éliminer en cas de besoin. Les résultats précliniques chez la souris montrent une éradication tumorale significative, et l'induction d'une mémoire immunitaire durable protégeant contre les récidives. La thèse développe enfin une version allogénique « off-the-shelf », plus scalable et économiquement viable qu'un modèle autologue, et discute les défis réglementaires (ATMP), industriels et de marché pour une future translation clinique.

<u>Membres du jury</u> :
Président : Madame le Professeur Julie DEMARET, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier - Faculté de Pharmacie de Lille, Centre Hospitalier Universitaire de Lille

Directeur de Thèse : Madame le Docteur Kadiombo BANTUBUNGI-BLUM**,** Maître de conférences des Universités - Faculté de Pharmacie de Lille, Centre Hospitalier Universitaire de Lille

Assesseur(s) : Madame le Docteur Julie DUMONT**,** Professeur des Universités
Faculté de Pharmacie de Lille, Centre Hospitalier Universitaire de Lille
Monsieur le Docteur Dao PHAN, Directeur de Recherche Clinique -Faculté de Pharmacie de Lille, Bayer HealthCare SAS

Membre(s) extérieur(s) : Monsieur Jérémy MAGALON, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier - Faculté de Pharmacie, Aix-Marseille Université – Assistance Publique–Hôpitaux de Marseille (AP-HM)