



Université de Strasbourg
FACULTÉ DE PHARMACIE

N° d'ordre: 2356

MÉMOIRE DE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

—

LES CAR-T CELL DANS LES TUMEURS SOLIDES

Présenté par Marie RAUSCH

Soutenu le 30 avril 2024 devant le jury constitué de

Pr. SOULAS -SPRAUEL Pauline, Président

Dr. GIES Vincent, Directeur de thèse

Dr. ALALOUT Nadia, Autres membres du jury

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



Doyen Esther KELLENBERGER
Directeurs adjoints Julien GODET
 Béatrice HEURTAULT
 Emilie SOK
Directeur adjoint étudiant Léo FERREIRA-MOURAUX

LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT

Professeurs :

Philippe	BOUCHER	Physiologie
Nathalie	BOLLANGER	Parasitologie
Line	BOUREL	Chimie thérapeutique
Pascal	DIDIER	Biophotonique
Said	ENNAHAR	Chimie analytique
Valérie	GEOFFROY	Microbiologie
Philippe	GEORGE	Bactériologie, Virologie
Jean-François	GES	Pharmacologie moléculaire
Béatrice	HEURTAULT	Pharmacie galénique
Esther	KELLENBERGER	Bio-Informatique
Maxime	LEHMANN	Biologie cellulaire
Eric	MARCHON	Chimie analytique
Francis	MEGERLIN	Droit et économie pharm.
Yves	MELY	Physique et Biophysique
Jean-Yves	PABST	Droit Economie pharm.
Françoise	FONS	Toxicologie
Valérie	SCHIN-KERTH	Pharmacologie
Florence	TOIT	Pharmacologie
Thierry	VANDAMME	Biogalénique
Catherine	VONTHRON	Pharmacognosie
Pascal	WEHLÉ	Pharmacie galénique

Professeurs-praticiens hospitaliers

Julien	GODET	Biostatistiques - science des données
Jean-Marc	LESSINGER	Biochimie
Bruno	MICHEL	Pharm. clinique santé publique
Pauline	SOLLAS SPRAUEL	Immunologie
Geneviève	UBEAUD-SÉQUIER	Pharmacocinétique

Enseignants contractuels

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

Maîtres de Conférences :

Nicolas	ANTON	Pharmacie biogalénique
Fareeha	BATOO	Biochimie
Martine	BERGENTZLÉ	Chimie analytique
Elisa	BOMBARDA	Biophysique
Aurélien	BOURDEROUX	Pharmacochimie
Emmanuel	BOUTANT	Virologie et Microbiologie
Véronique	BRUBAN	Physiologie et physiopath.
Anne	CASSET	Toxicologie
Thierry	CHATAIGNEAU	Pharmacologie
Manuela	CHIFER	Pharmacie biogalénique
Guillaume	CONZATTI	Pharmacie galénique
Marcella	DEGORG	Pharmacochimie
Serge	DUMONT	Biologie cellulaire
Gsèle	HAAN-ARCHPOFF	Plantes médicinales
Célien	JACQUEMARD	Chémoinformatique
Sonia	KARRENKO	Pharmacochimie
Sonia	LORDEL	Chimie analytique
Carisse	MAECHLING	Chimie physique
Rachel	MATZ-VESTIHAL	Pharmacologie
Cherifa	MEHADJI	Chimie
Nathalie	NEDEROFFER	Pharmacologie
Sergio	CRIZAGUIRRE	Pharmacognosie
Sylvie	FERROTEY	Parasitologie
Romain	FERTSCH	Chimie en flux
Frédéric	FRZYBILLA	Biostatistiques
Patrice	RASSAM	Microbiologie
Eléonore	REAL	Biochimie
Andreas	REISCH	Biophysique
Ludvine	RIFFAULT-VALOS	Analyse du médicament
Carole	RONZAN	Toxicologie
Emilie	SOK	Pharmacologie
Yaouba	SOUABOU	Pharmacognosie
Maria-Vittoria	SPANEDA	Chimie thérapeutique
Jérôme	TERRAND	Physiopathologie
Nassera	TOUNS	Chimie physique
Aurélien	URBAN	Pharmacognosie
Bruno	VANOVERLOOP	Physiologie
Maria	ZENOU	Chimio génomique

Maîtres de conférences - praticiens hospitaliers

Julie	BRUNET	Parasitologie
Nelly	ÉTIENNE-SELLOUM	Pharmacologie- pharm. clinique

Assistant hospitalier universitaire

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

SERMENT DE GALIEN

JE JURE,

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

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

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

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

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

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu les personnes qui m'ont fait l'honneur de juger la pertinence de ce travail.

À Vincent GIES,

Je vous remercie, en tant que directeur de thèse, de m'avoir permis de réaliser cette thèse qui me tenait à cœur. Merci pour le temps que vous m'avez accordé, pour les bons conseils et votre bienveillance à mon égard tout au long de ma thèse et de mon cursus.

À Pauline SOULAS-SPRAUEL,

Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse et d'étudier mon travail. Vos enseignements clairs et structurés m'ont permis de développer une appétence pour le domaine de l'immunologie.

À Nadia ALALOUT,

Je vous remercie d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse. Grâce à vous, je garde un très bon souvenir de mon passage à Paris où j'ai pu y découvrir les CAR-T cell, qui est le sujet principal de ma thèse.

Un immense merci aux enseignants de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg pour leur dévouement et leur précieuse contribution à mon parcours académique. Leurs enseignements m'ont armés des connaissances nécessaires pour entamer ma vie de pharmacienne.

Je souhaite ensuite remercier tous ceux qui ont compté pendant ces années d'études, qui m'ont soutenu et aussi avec lesquels j'ai beaucoup ri.

À ma famille, vous m'avez depuis toujours donné l'envie et la force de réussir. Vous m'avez porté toujours plus loin. Je vous en serai à jamais reconnaissante.

À Jules, sans toi mes études en Pharmacie n'auraient pas été les mêmes !! Merci pour les rires, le soutien, les TP et aucune de nos options en commun. Trêve de rigolade merci beaucoup pour ta relecture, qui m'a été très précieuse et qui encore une fois de plus a su montrer tes talents cachés.

À mes meilleures amies :

Louella et Perrine, merci pour ces belles années passées ensemble et pour toutes celles qui nous restent. Et, je crois bien que je peux dire merci à la PACES pour nous avoir rassemblées à la bibliothèque pendant 1 ans.

À tous mes camarades pharmaciens :

À Lucas, qui m'accompagne dans mes aventures depuis la 2^{ème} année, que ce soit à la faculté de pharmacie, en Belgique ou en Guadeloupe, merci d'être là.

À Lina, merci pour ton amitié et pour toutes nos interrogations qui j'en suis sûre nous mèneront loin.

À Lise, Charlotte et Laura sans qui les cours de cancérologie ou les repas Dyonisos aurait été moins passionnants !!

Et merci à tous les autres camarades pour ces belles années.

Table des matières

<i>Remerciements</i>	4
<i>Acronymes</i>	8
<i>Liste des figures et tableaux</i>	11
I. Introduction	12
II. La technologie des CAR-T Cell	14
1) Le principe des CAR-T cell	14
2) Mécanismes immunologiques.....	14
3) Le design du récepteur CAR.....	16
a. Domaine extracellulaire.....	16
b. Le <i>Spacer</i> extracellulaire	17
c. Domaine transmembranaire	18
d. Domaine cytoplasmique	18
e. Les différentes générations de CAR	18
4) Production des CAR-T cell.....	20
a. Leucaphérèse	21
b. Activation <i>in-vitro</i> des lymphocytes T	22
c. Transduction des lymphocytes T en CAR-T cell.....	22
d. Expansion	23
e. Contrôles	24
f. Administration au patient.....	24
g. Traitement avec approches allogéniques	25
5) Indications.....	26
a. Lymphome à cellules B et leucémie	26
b. Les CAR-T cell indiquées dans les lymphomes à cellules B et leucémie en France.....	28
c. Myélome multiple (MM).....	30
d. Les CAR-T cell indiquées dans les myélomes multiples en France.....	31
6) Effets Indésirables des CAR-T cell.....	31
a. Syndrome de relargage des cytokines	32
b. Neurotoxicité	34
c. Autres toxicités	35
7) Les essais cliniques portant sur des CAR-T cell.....	36
III. Les Car-T cell dans les tumeurs solides	37
1) Les tumeurs solides	37
a. Généralités sur les tumeurs solides.....	37
b. Le microenvironnement tumoral	38

c. Système immunitaire et tumeurs solides	41
2) Les défis à relever pour l'application des CAR-T cell dans les tumeurs solides	43
a. Le choix de l'antigène	43
b. Le chemin jusqu'à la tumeur : la migration des CAR-T cell.....	44
c. Le microenvironnement tumoral : environnement hostile pour les CAR-T cell.....	46
3) Stratégies utilisées pour l'application des CAR-T cell dans les tumeurs solides	49
a. Optimisation du CAR	49
b. Améliorer la migration des CAR-T cell.....	53
c. Contourner le microenvironnement hostile faible en oxygène et nutriments.....	55
d. Contourner un microenvironnement tumoral immunosuppresseur	57
e. Lutter contre l'épuisement des CAR-T cell	59
f. Cellules immunitaires alternatives	61
4) Applications : études cliniques portant sur les CAR-T cell dans les tumeurs solides	62
a. Les Antigènes cibles	62
b. Persistance des CAR-T cell obtenues en clinique	71
c. Premières victoires dans l'application des CAR-T cell dans les tumeurs solides.....	73
<i>IV. Conclusion.....</i>	<i>75</i>
<i>Bibliographies</i>	<i>78</i>

Acronymes

AAP : Autorisations d'accès précoces

ACE : Antigène carcinoembryonnaire

AMM : Autorisation de mise sur le marché

ANSM : Agence Nationale de sécurité du médicament et des produits de santé

ATP : Adénosine triphosphate

BHE : Barrière hématoencéphalique

CAR : Récepteurs chimériques à l'antigène

CCL2 : Chimiockines ligand-2

CCR7 : Récepteur CC de la chimiokine 7

CD : Cellule dendritique

CLDN18.2 : Claudine 18.2

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : Cellules présentatrices d'antigènes

CPNPC : Cancer du poumon non à petite cellules

CRISPR-Cas9 : *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats 9*

CRS : Syndrome de libération de cytokines

CTLA-4 : *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*

D-2HG : D-2 hydroxyglutarate

EBMT : *European Society of Blood and Marrow Transplantation*

EGFR : Récepteur du facteur de croissance épidermique

EHA : *European Hematology Association*

EMA : Agence Européenne des Médicaments

EpCAM : *epithelial cell adhesion molecule*

FDA : *Food and Drug Administration*

GM-CSF : *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*

GPC3 : Glypican-3

GvHD : Maladie greffon contre hôte

HER 2 : *Human Epidermal growth factor Receptor-2*

ICANS : Syndrome de neurotoxicité associée aux cellules effectrices immunitaires

ICE : *Immune Effector Cell Encephalopathy*

IDH : Isocitrate déshydrogénase

IDO : Indoleamine-2,3-dioxygénase

IFN : Interféron

IL : Interleukine

IL13Ra2 : Récepteur alpha 2 de l'interleukine 13

IRM : imagerie par résonance magnétique

ITAM : Motifs d'Activation des Tyrosines Immunitaires

LAG-3 : *lymphocyte activation gene 3*

LAL : Leucémie aiguë lymphoblastique

LDH : Lactate déshydrogénase

LLC : Leucémie lymphoïde chronique

LT : Lymphocyte T

MCP-1 : Protéine chimioattractante monocyttaire-1

MDSC : Cellules suppressives myéloïdes

MEC : Matrice extracellulaire

MET : Microenvironnement tumoral

MM : Myélome multiple

MUC1 : Mucine-1

NIH : *National Institute of Health*

NK : *Natural Killer*

NKG2D : *Natural Killer Group 2D*

PCI : Point de contrôle immunitaire

PCR : Réaction en chaîne de la polymérase

PD-1 : *Programmed cell Death protein 1*

PD-L1 : *Programmed cell death ligand-1*

PEDD : *Pressure-Enabled Drug Delivery*

PSMA : Antigène membranaire spécifique de la prostate

R/R : Rechute et/ou réfractaires

RIAD : Perturbateur d'ancrage de la sous-unité régulatrice I

ROS : Spécimens réactifs de l'oxygène

ScFV : fragments variables simple chaîne

SI : Système immunitaire

sLeX : *cognate sialyl Lewis-X*

SNC : Système Nerveux Central

TAA : Antigène associé aux tumeurs

TALLEN : *Transcription Activator-Like Effector Nuclease*

TAM : Macrophages associées aux tumeurs

TCR : Récepteur à l'antigène du lymphocyte T

TIM-3 : *T-cell immunoglobulin and mucin domain containing protein 3*

TNF : Facteur de nécrose tumorale

Treg : Lymphocyte T régulateur

VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

VEGFR2 : Récepteur 2 du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

ZFN : Nucléases à doigts de zinc

Liste des figures et tableaux

Figure 1 Mécanisme d'action des CAR-T cell (6).....	14
Figure 2 Schéma du récepteur à l'antigène lymphocyte T (TCR) (7).....	15
Figure 3 Schéma du Récepteur chimérique à l'antigène (CAR) (8)	16
Figure 4 Schéma représentant les différentes générations du récepteur chimérique à l'antigène (CAR) (13)	20
Figure 5 Étapes clés de la production de CAR-T cell autologues (6).....	21
Figure 6 Étapes de production CAR-T cell avec approche allogénique (14).....	26
Figure 7 Structure du CAR (Récepteur chimérique à l'antigène) des CAR-T cell approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) (23)	30
Figure 8 Effets indésirables les plus fréquents et leurs symptômes lors de traitement par CAR-T cell (6)	32
Figure 9 Schéma chronologiques de l'apparition des effets indésirables majeures des CAR-T cell : syndrome de relargages des cytokines (CRS) et neurotoxicité (ICANS) ainsi que les niveaux de cytokines exprimé (32)	33
Figure 10 Grade syndrome de relargages des cytokines (CRS) réalisé par the <i>European Society of Blood and Marrow Transplantation</i> (EBMT) et the <i>European Hematology Association</i> (EHA) (11)	34
Figure 11 Schéma représentant le principe de l'immunoédition dans le cancer (39).....	41
Figure 12 Schéma représentant les différentes étapes de la migration des CAR- T cell jusqu'à la tumeur(45).....	48
Figure 13 CAR-T cell multi-spécifiques (12)	49
Figure 14 Nouvelles générations de CAR multi spécifiques à logiques booléenne (12).....	51
Figure 15 Schéma représentant les CAR de nouvelles générations : CAR SynNotch et AvidCAR (12).....	52
Figure 16 Illustration de CAR-T cell guidée par des probiotiques (ProCAR) (53)	53
Figure 17 Illustration des HypoxiCAR-T cell (56).....	56
Figure 18 CAR-Macrophage (12)	61
Figure 19 Schéma représentant les antigènes associés aux tumeurs étudiés en clinique pour l'application des CAR-T cell dans les tumeurs solides (65).....	63
Figure 20 Résultats cliniques après perfusion de CAR-T cell spécifiques du récepteur d'antigène chimérique HER2 (HER2-CAR VST) (66)	65
Figure 21 Suivi au long terme des patients ayant reçu des CAR-T cell anti-GD2 (68).....	68
Figure 22 Ciblage des gliomes diffus de la ligne médiane mutants H3-K27M par thérapie CAR-T cell anti-GD2 (70,71)..	69
Figure 23 Persistance des CAR-T cell étudiées en clinique dans les tumeurs solides (47)	73
Tableau 1 Composant cellulaires et non cellulaires majeurs du microenvironnement tumoral (38)	38

I. Introduction

Les médicaments de thérapie innovante apparaissent comme une grande avancée dans la prise en charge de nombreux cancers. C'est parmi eux que s'inscrivent les CAR-T cell. Les CAR-T cell combinent thérapie cellulaire et thérapie génique et ont révolutionné la prise en charge de certains cancers.

L'un des premiers éléments fondateurs des cellules CAR-T remonte à 1980, lorsque le Dr Rosenberg a initié le transfert de lymphocytes en extrayant des lymphocytes infiltrant une tumeur de mélanome, les cultivant ensuite en laboratoire, et observant des rémissions prolongées lors de leur réinjection. Simultanément, vers la fin des années 1980, les progrès en génétique et en rétrovirologie ont ouvert la voie à une nouvelle méthode de transfert de gènes, permettant désormais l'introduction stable de gènes artificiels ou synthétiques dans les cellules eucaryotes.

Ces avancées ont suscité l'idée de combiner la spécificité des anticorps avec la puissance d'action des lymphocytes T (LT), en utilisant un gène chimérique codant pour un récepteur chimérique à l'antigène (CAR). Les CAR ont été conceptualisés par Eshhar et ses collaborateurs dans le but d'exploiter les LT naturels tout en contournant la restriction liée au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) associé au récepteur des LT (TCR), afin d'accroître leur applicabilité thérapeutique. La conception actuelle des CAR dérive de ces découvertes et consiste en trois modules différents : un domaine extracellulaire de liaison à l'antigène relié, une partie transmembranaire puis un domaine de signalisation intracellulaire.

Au cours de la dernière décennie, les scientifiques et les cliniciens ont pris conscience de la valeur de la thérapie par CAR-T cell dans la lutte contre le cancer du sang. Les premiers essais cliniques de CAR-T cell ont été initiés à l'hôpital pour enfants de Philadelphie en 2011 en incluant des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique (LLC). En 2012, un autre essai avec des patients atteints de leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) a également eu lieu. Dans ces essais, des taux de rémission jamais vus jusqu'alors ont été atteints et de nombreux patients atteints de maladies très réfractaires ont été guéris. Le cas d'Emily Whitehead est particulièrement notable. Elle a reçu un traitement par CAR-T cell à l'âge de 6 ans dans le cadre de sa LAL réfractaire. En 2023, elle célèbre ses 11 ans de guérison. Les premiers succès des CAR-T cell ont conduit à leurs approbations par la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis en 2017 et par l'Agence Européenne des Médicament (EMA) en 2018, ce qui les a propulsées sur le devant de la scène mondiale.

Jusqu'à présent, l'efficacité clinique de la thérapie CAR-T cell est principalement observée dans le traitement des cancers du sang liés aux lymphocytes B (LB) et aux plasmocytes. En revanche, l'application de cette thérapie à d'autres cancers hématologiques tels que le syndrome myélodysplasique ou la leucémie myéloïde aiguë est plus complexe. Étendre l'utilisation de la thérapie CAR-T cell aux traitements des cancers solides présente également des défis supplémentaires tels que l'identification

d'antigènes tumoraux cibles, les difficultés d'accès des CAR-T cell à la tumeur et les influences immunosuppressives. Ces obstacles demeurent des défis significatifs qui nécessitent encore des recherches et des solutions innovantes.

Cette thèse aspire à examiner les défis spécifiques auxquels les CAR-T cell sont confrontées lorsqu'elles s'attaquent aux tumeurs solides. En analysant de près ces enjeux, nous pourrions non seulement mieux comprendre les obstacles à surmonter, mais aussi identifier les opportunités d'optimisations de cette technologie pour des résultats thérapeutiques plus efficaces. La première partie de cette thèse se consacrera au principe fondamental des CAR-T cell, explorant leurs conceptions ainsi que leurs applications. Cette partie permettra d'établir une fondation solide pour comprendre les défis auxquels ces cellules sont confrontées lorsqu'elles interagissent avec les tumeurs solides. La seconde partie de cette thèse se concentrera sur l'application des CAR-T cell dans les tumeurs solides notamment en introduisant les tumeurs solides, les challenges rencontrés et les innovations visant à les contourner.

Le mot « CAR -T cell » étant un anglicisme, pour ce travail il sera arbitrairement mis au féminin et s'écrira CAR-T cell tout au long du mémoire.(1-4)

II. La technologie des CAR-T Cell

1) Le principe des CAR-T cell

Les CAR-T cell sont conçues pour renforcer la capacité du système immunitaire afin de cibler et éliminer les cellules cancéreuses. Les CAR-T cell sont créés en prélevant les propres lymphocytes du patient à l'aide d'une leucaphérèse. Puis, en laboratoire, le CAR est inséré dans les cellules. Les CAR sont des protéines synthétiques qui redirigent les cellules immunitaires vers une cible d'intérêt. Ici, les CAR sont exprimés sur les LT (*T cell* en anglais) d'où l'appellation CAR-T cell. Ce récepteur permet de cibler spécifiquement un antigène présent à la surface des cellules cancéreuses comme on peut le voir sur la *figure 1*. Une fois que les LT ont été génétiquement modifiés pour exprimer le récepteur, ils sont multipliés en grand nombre en culture. Les cellules sont par la suite réintroduites dans le patient par voie intraveineuse. Les CAR-T cell sont capables de reconnaître les cellules cancéreuses porteuses de l'antigène cible et de les détruire. (5)

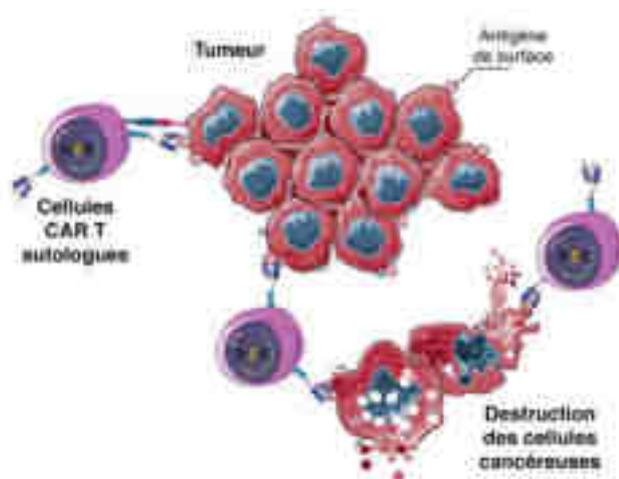


Figure 1 Mécanisme d'action des CAR-T cell (6)

Les thérapies par CAR-T cell utilisent les lymphocytes T du système immunitaire afin de traiter le cancer. Les CAR-T cell autologues reconnaissent les cellules cancéreuses à l'aide de l'antigène de surface et les détruisent.

2) Mécanismes immunologiques

Ce rappel permettra de mieux comprendre les mécanismes d'actions de CAR-T cell et la construction du CAR qui sera abordée dans la partie suivante. Illustré sur la *figure 2*, le TCR se compose du TCR $\alpha\beta$ lié de manière non-covalente aux protéines CD3. La reconnaissance de l'antigène par le TCR est assurée par la partie variable des chaînes α et β . Ces chaînes possèdent également une partie constante (la plus proche de la membrane). La transduction des signaux sont transmises à l'aide des chaînes des complexes CD3 et de leurs motifs moléculaires particuliers : les ITAM (Motif d'Activation des Récepteurs Immuns basé sur la tyrosine). Les domaines CD4 et CD8 (en fonction du sous-type de lymphocyte) sont des co-récepteurs des LT qui se lient aux régions constantes des molécules CMH indépendamment de l'antigène. Ils permettent de stabiliser l'interaction TCR avec le complexe CMH/peptide et ainsi l'activation du TCR.(7)

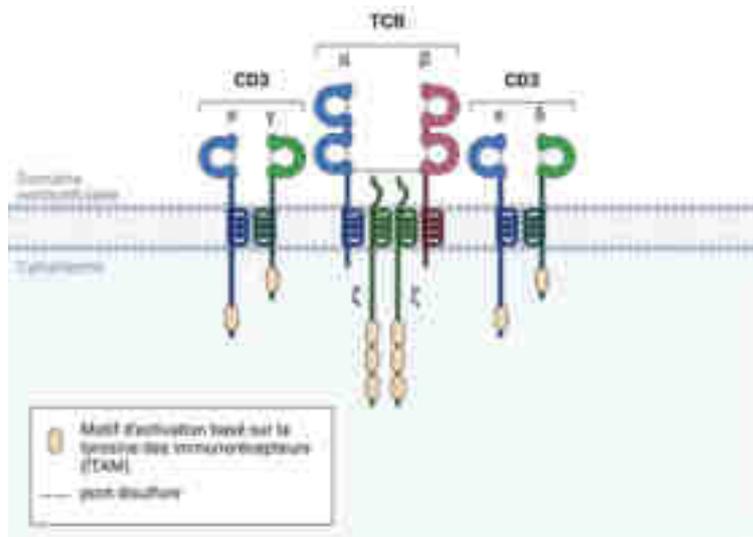


Figure 2 Schéma du récepteur à l'antigène lymphocyte T (TCR) (7)

La partie transmembranaire du TCR est constituée d'acides aminés basiques ce qui lui confère une charge électrostatique positive afin de s'associer à d'autres protéines, telles que le complexe CD3 qui lui est chargé négativement. Le complexe CD3 est composé de trois chaînes différentes (γ , δ et ϵ), ainsi que la chaîne ζ . Lorsque les molécules CD3 s'assemblent avec le TCR, elles forment le complexe TCR. Étant donné que la partie cytoplasmique du TCR est très courte le complexe CD3 va permettre la transmission des signaux depuis le TCR. (Schéma réalisé à partir de Biorender)

L'activation des LT requiert trois signaux :

- **Le Premier signal** correspond à l'interaction spécifique entre le TCR et l'antigène présenté par les molécules CMH sur la surface d'une cellule présentatrice de l'antigène.
- **Le Deuxième signal** est fourni par des molécules de co-stimulation tels que CD28 à la surface du LT et CD80/CD86 sur la surface d'une cellule présentatrice de l'antigène
- **Le Troisième signal** provient des cytokines produites par d'autres cellules immunitaires notamment par les LT auxiliaires. Ces cytokines orientent la réponse immunitaire et la différenciation des LT en sous-types appropriés. (7)

Les LT cytotoxiques servent de base à la production des CAR-T cell. Ils sont constitués du domaine CD8 qui permet la reconnaissance du CMH de type I. Une fois l'antigène reconnu par les LT cytotoxiques, l'activation des voies de transduction conduit à l'exocytose de protéines (granzymes et perforines), déclenchant ainsi l'apoptose de la cellule visée. (7)

3) Le design du récepteur CAR

Les CAR sont des récepteurs synthétiques polyvalents qui permettent une liaison conjointe à l'antigène et aux lymphocytes. Dans les CAR-T cell, les CAR sont exprimés sur des LT leurs permettant de cibler et détruire de façon spécifique les cellules tumorales. Lorsque le CAR interagit avec son ligand, une signalisation qui implique divers composants du TCR naturel se déclenche.

Actuellement, la conception du CAR dérive de ces découvertes et regroupe plusieurs modules (*figure 3*) :

- un domaine extracellulaire de liaison à l'antigène,
- un *spacer* extracellulaire (charnière),
- un domaine transmembranaire,
- un ou plusieurs domaines cytoplasmiques.(5)

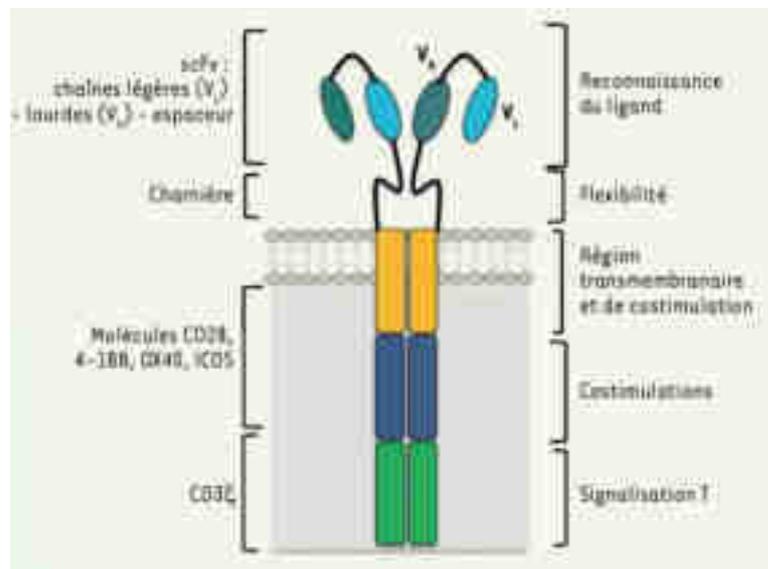


Figure 3 Schéma du Récepteur chimérique à l'antigène (CAR) (8)

Le prototype des CAR est composé de trois domaines : un domaine qui permet la liaison à l'antigène (le fragment variable à chaîne unique de l'immunoglobuline (ScFV)), un domaine qui permet l'activation du lymphocyte T (généralement le domaine intracellulaire de la chaîne CD3ζ) et un domaine de co-stimulation : tel que le domaine intracellulaire de CD28, par exemple. Dans les CAR de troisième génération, des domaines intracellulaires tels que CD137/4-1BB, CD134/OX40 ou ICOS sont ajoutés à la conception.

Au cours des dernières années, les CAR ont été optimisés sur les plans immunologiques et technologiques, avec plusieurs générations selon leurs compositions pour optimiser la survie *in vivo* des cellules, optimiser le traitement et diminuer les effets indésirables.(9)

a. Domaine extracellulaire

Tout d'abord, le domaine extracellulaire utilisé classiquement est le ScFV (fragments variables chaîne simple) en raison de la spécificité et de l'affinité élevée pour les antigènes cibles. Il se compose exclusivement des domaines variables des chaînes lourdes (VH) et légères (VL) des anticorps, reliées

par un lien peptidique flexible, généralement constitué de quinze acides aminés. L'avantage de l'utilisation d'un ScFV est que, contrairement au TCR, la reconnaissance antigénique n'est pas limitée à des peptides antigéniques présentés par les CMH. Ainsi, les CAR sont utilisables peu importe les haplotypes HLA de l'individu. D'autres domaines de liaisons aux ligands ont été explorés comme les nanocorps (fragment d'anticorps composé d'un seul domaine d'anticorps variable) comme ligands pour les récepteurs connus. (10,11)

La sélection du domaine de liaison au ligand est un élément clé dans la conception du CAR puisqu'il influence la spécificité et l'efficacité de la thérapie. Le choix du domaine extracellulaire résulte de l'affinité et de l'avidité du récepteur pour l'antigène associé aux tumeurs (TAA).(10)

Choix de l'antigène

Actuellement, les CAR-T cell utilisées en clinique ne reconnaissent pas d'antigènes cibles spécifiques des tumeurs, mais des antigènes propres aux LB (CD19) ou des antigènes de maturation des lymphocytes B (BCMA), qui sont des molécules exprimées à la membrane des cellules malignes et saines.

Différents critères permettent de définir un bon antigène tumoral pour la reconnaissance par une CAR-T cell :

- Il doit être exprimé à la surface membranaire ;
- Il est uniformément exprimé sur les cellules cancéreuses ;
- Il n'est pas soumis à une régulation (notamment baisse ou suppression) afin d'anticiper tout échappement possible et de garantir qu'il est essentiel au développement de la tumeur ;
- Idéalement, il devrait être exprimé sur les cellules souches malignes ;
- Il ne devrait pas être exprimé dans les tissus normaux, c'est-à-dire qu'il devrait être spécifique aux cellules cancéreuses.

Les antigènes spécifiques aux tumeurs résultent de mutations génétiques au sein des cellules malignes. Ces mutations créent de nouveaux antigènes nommés : néoantigènes. Les néoantigènes ne se trouvent pas dans les cellules saines non malignes. Par conséquent, la probabilité de provoquer une toxicité hors de la tumeur est faible. Malheureusement, il n'existe pas d'antigène extracellulaire non polymorphe spécifique des tumeurs.(11)

b. Le *Spacer* extracellulaire

Le *spacer* extracellulaire (également nommé charnière sur la *figure 3*) sert de liaison entre le domaine extracellulaire et le domaine transmembranaire, ainsi il apporte une souplesse au fragment ScFV. Les *spacer* extracellulaires utilisés en clinique sont des *spacer* non basés sur des IgG mais sur les régions CD8 et CD28. Il contribue à améliorer l'efficacité en permettant la reconnaissance d'épitopes difficilement accessibles du fait de certaines contraintes stériques. Ainsi, il sert à réguler les distances

entre les fentes synaptiques. Par exemple, un mauvais ajustement du domaine *spacer* extracellulaire peut perturber l'acheminement des granzymes et des perforines vers la cellule cible et de cette façon réduire l'efficacité lytique des CAR-T cell. En plus du rôle clé dans la signalisation CAR, le *spacer* est également utilisé pour quantifier et purifier les sous-ensembles de CAR-T cell lors de la production.(9,10)

c. Domaine transmembranaire

Le domaine transmembranaire est la partie qui permet de faire le lien entre le domaine intra et extracellulaire. Il est généralement issu des protéines CD3 ζ (chaîne zêta du complexe TCR/CD3 *figure 2*), CD4, CD8 et CD28. Le domaine transmembranaire CD3 ζ est incorporé en position « cis » dans les CAR de première génération. Cette configuration entraîne une augmentation de CD3 ϵ et interagit avec les chaînes TCR α et β du TCR par le biais d'interactions ioniques. Les unités de signalisation du complexe TCR-CD3 endogènes se trouvent ensuite également impliquées, permettant l'activation du LT. De la même manière que le *spacer*, le choix du domaine transmembranaire permet de jouer sur la stabilité du CAR. Les interactions transmembranaires peuvent aussi être exploitées pour concevoir de nouveaux types de CAR, comme de nouvelles conceptions avec des configurations en position « trans » qui semblent imiter l'architecture des TCR à chaînes multiples et potentiellement donner lieu à des réponses physiologiques.(9,10)

d. Domaine cytoplasmique

Le domaine cytoplasmique permet l'activation du TCR. Le domaine cytoplasmique des CAR-T cell de première génération contient une partie cytoplasmique de CD3 ζ . La fraction CD3 ζ présente une meilleure efficacité chez les CAR-T cell utilisées en clinique. Les ITAM situés sur les domaines cytoplasmiques des complexes TCR-CD3 permettent le recrutement de Zap70 (une protéine essentielle dans la cascade de signalisation du TCR) via des phosphorylations. La diversité et la quantité d'ITAM CD3 ζ permettent une signalisation optimale des LT. Il en est de même pour les CAR -T cell : le nombre d'ITAM fonctionnels constitue un pilier pour permettre une efficacité optimale.

Chez les CAR de générations suivantes : des signaux de co-stimulation sont généralement inclus avec le domaine cytoplasmique CD3 ζ . Le nombre, la nature des signaux de co-stimulation, leurs séquences et leurs proximités par rapport à la membrane ont été beaucoup abordés dans la littérature et permettent également de différencier les différentes générations de CAR (*notion abordée dans la partie suivante*). (9,10)

e. Les différentes générations de CAR

Les CAR-T cell ont évolué au fil du temps avec différentes générations, chaque génération apporte des améliorations spécifiques pour améliorer leur efficacité et leur sécurité. Dans ce paragraphe, les différentes générations de CAR-T cell sont introduites, en mettant en évidence les avancées importantes qui ont été faites depuis le début.

Les CAR de première génération (*figure 4*) se composent principalement d'un seul domaine activateur : la chaîne ζ du CD3. Bien qu'elles aient manifesté une certaine activité antitumorale, ces cellules sont limitées en matière de persistance et d'efficacité clinique. C'est alors qu'est arrivée la deuxième génération de CAR, qui a résolu certains de ces problèmes. En ajoutant de domaines co-stimulateurs comme CD28 ou 4-1BB, les scientifiques ont amélioré la capacité des cellules à rester actives et à se multiplier, ce qui a permis d'obtenir à des résultats cliniques plus encourageants. Cette approche permet d'optimiser la réponse au traitement en fournissant un signal de co-stimulation supplémentaire. Il est important de souligner que les CAR-T cell actuellement approuvées sont des CAR de deuxième génération. Par exemple le CAR de tisagenlecleucel (Kymriah[®]) contient un domaine 4-1BB et axicabtagene ciloleucel (Yescarta[®]) contient un domaine CD28. (9,10)

Les CAR-T cell de troisième génération représentent une avancée majeure en intégrant deux domaines co-stimulateurs, tels que CD28 ou 4-1BB, avec le domaine activateur CD3 ζ . Cette modification vise à améliorer la réponse immunitaire en modulant les signaux de costimulations. Les résultats observés dans les essais cliniques sont prometteurs et montrent une efficacité potentielle dans le traitement de divers cancers. Cependant, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre et réguler les réponses immunitaires de ces cellules. (12,13)

Le progrès scientifique permet des modifications plus complexes et contribue à de nouvelles générations. Les TRUCKs (*T cell Redirected for Universal Cytokine-Mediated Killing*) (*figure 4*) sont en effet une extension des CAR-T cell et pourraient être considérés comme une approche de quatrième génération. Les TRUCKs sont actuellement encore au stade d'essais précliniques. Les TRUCKs sont conçus pour sécréter des cytokines, qui agissent comme signal pour attirer d'autres cellules immunitaires et renforcer la réponse antitumorale. Bien que les recherches sur les TRUCKs soient encore en cours, les premiers résultats suggèrent un fort potentiel. (12,13)

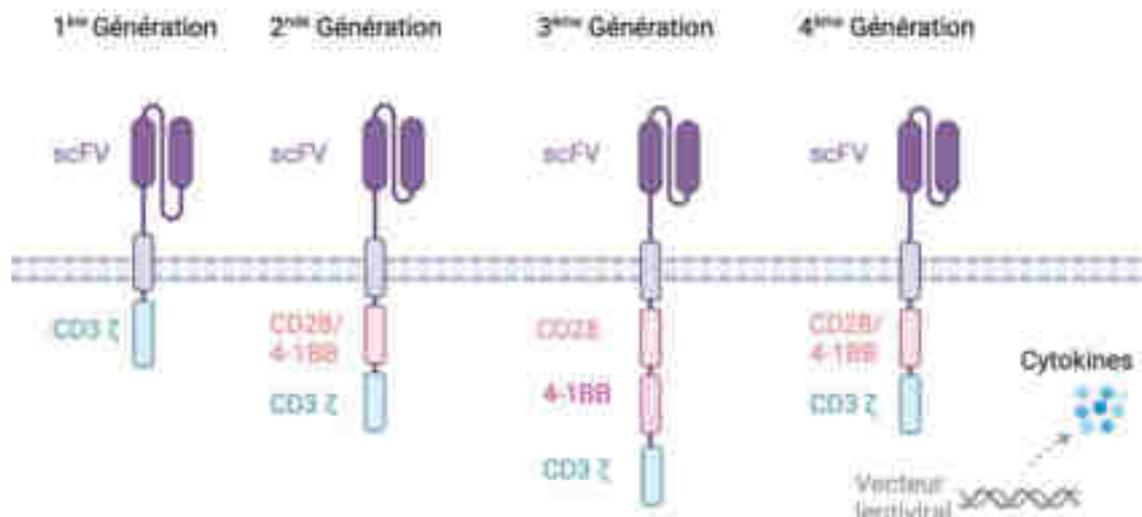


Figure 4 Schéma représentant les différentes générations du récepteur chimérique à l'antigène (CAR) (13)

Les différentes générations de CAR incluent le CD3- ζ du complexe du Récepteur des Lymphocytes T (TCR) et varient en termes du nombre de molécules co-stimulantes, notamment les domaines intracellulaires du CD28 et du 4-1BB. Les CAR de première génération présentent des limitations dans leur activation complète en raison de l'absence de molécules co-stimulantes. Les CAR-T cell de quatrième génération partagent des structures similaires à celles de la deuxième génération, mais intègrent également des gènes supplémentaires codants pour des cytokines, ce qui optimise leurs capacités fonctionnelles. (Schéma réalisé à partir de biorender)

Ces avancées, des CAR-T cell de troisième génération aux TRUCKs, reflètent la dynamique rapide de l'immunothérapie anticancéreuse. Ces progrès ne marquent qu'une étape préliminaire. L'avenir des CAR-T cell promet des thérapies encore plus complexes, alignées sur les caractéristiques individuelles des tumeurs, pour une lutte plus efficace contre le cancer.

4) Production des CAR-T cell

Les CAR-T cell varient en termes de conception et de région de liaison spécifique à l'antigène tandis que le processus de fabrication reste constant. Dans une approche autologue, les LT du patient sont prélevés, modifiés et réintroduits chez le même patient. Actuellement, seules les thérapies CAR-T cell autologue sont approuvées dans l'Union européenne. La fabrication des CAR-T cell reste un processus très coûteux et long : 1 à 3 mois pour la production et environ 1 mois pour l'envoi et l'administration aux patients. (11)

Les différentes étapes de production sont les suivantes et sont illustrées sur la *figure 5* :

- Leucaphérèse,
- L'activation *in-vitro* des LT,
- La transduction des LT en CAR-T cell,
- Expansion,
- Les contrôles,
- Administration au patient.

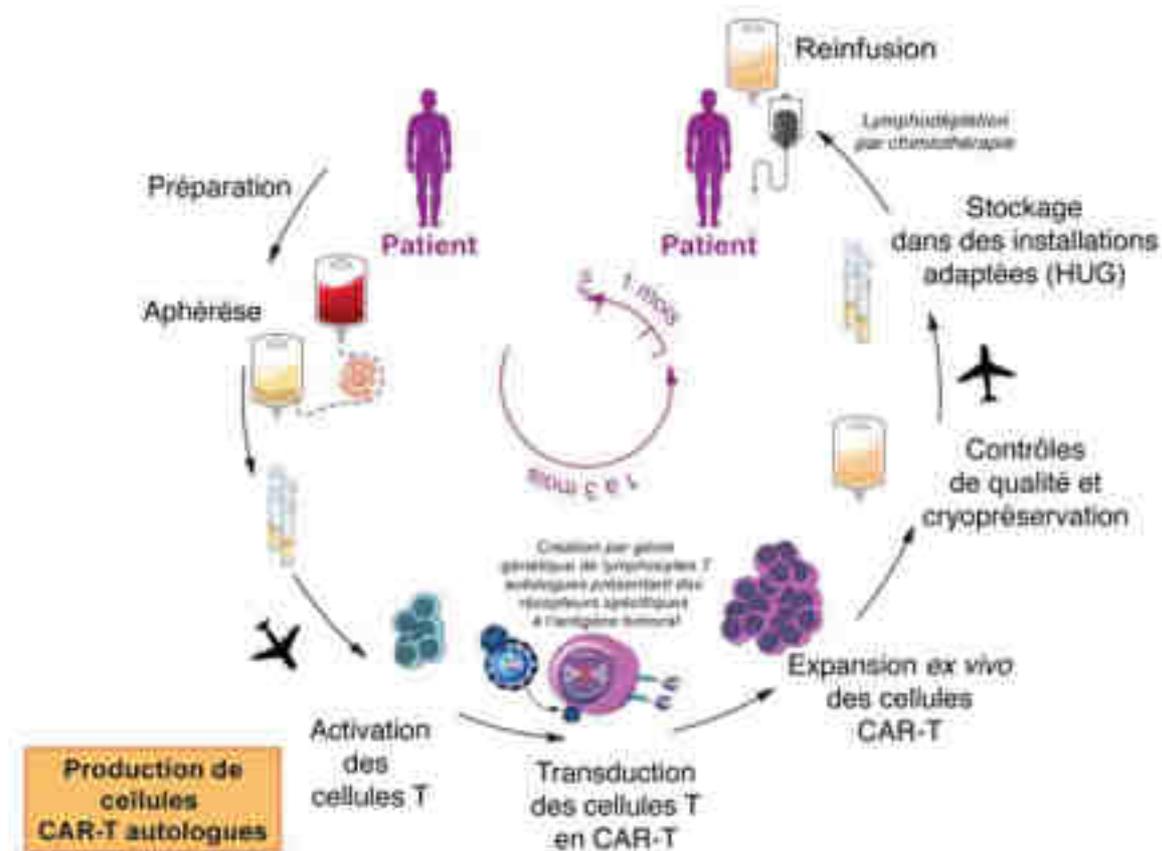


Figure 5 Étapes clés de la production de CAR-T cell autologues (6)

(1) Prélèvement des globules blancs en ambulatoire par aphérèse (4 heures en moyenne). (2) En laboratoire, les lymphocytes sont génétiquement modifiés pour devenir des CAR-T cell. Cette étape de modification prend environ quatre semaines et comprend l'activation des cellules T, leurs transductions en CAR-T ainsi que leurs expansions.(3) Contrôle qualité et cryopréservation (4) Injection des CAR-T cell modifiées. (5) Suivi médical en milieu hospitalier, généralement pendant une période de deux semaines.

a. Leucaphérèse

Le point de départ de la production de CAR-T cell provient du sang de patient obtenu par leucaphérèse. La leucaphérèse consiste à prélever les leucocytes d'une personne grâce à un appareil d'aphérèse. Lors d'une procédure d'aphérèse, les patients sont connectés à un dispositif qui transfère leurs sangs à travers un ensemble de tubes à usage unique. À l'aide de la force centrifuge et de capteurs optiques, le sang est divisé en différentes couches ce qui permet de collecter la couche cellulaire souhaitée. L'aphérèse reste la méthode la plus utilisée pour la production de CAR-T car cette technique permet un grand rendement cellulaire, ce qui est préférable notamment lorsque le nombre de LT est faible comme chez les patients atteints d'hémopathies malignes. (14)

Les LT collectés doivent maintenir leurs capacités à répondre aux différents signaux de stimulation, réussir le processus de transduction ainsi qu'accomplir leurs fonctions une fois réintroduites chez le patient. Ainsi, l'existence de certains groupes cellulaires au début de la culture peut avoir des répercussions négatives. Par exemple, la présence de cellules suppressives myéloïdes (MDSC) et de monocytes peut constituer un obstacle à l'activation et la multiplication *ex vivo* des LT. La qualité et la

quantité des cellules constituent un point de départ essentiel. C'est pour cela qu'une étape d'élu-triation des cellules obtenues est essentielle. L'élu-triation est un procédé permettant une analyse granulométrique et la séparation de particules en diverses catégories en se basant sur leurs dimensions, leurs morphologies et leurs masses. Une autre technique consiste à amasser les LT à l'aide de billes magnétiques conjuguées à des anticorps pour une sélection positive ou négative. La définition d'un ratio distinct de LT CD4+ et CD8+ dans le produit final peut sembler prévenir les toxicités tel que le syndrome de libération de cytokines.(14)

b. Activation *in-vitro* des lymphocytes T

Une fois les LT isolés, place à l'étape d'activation. Pour activer un LT un signal doit être transmis au niveau du TCR. Pour rappel (*approfondi dans la partie mécanisme immunologique*) : en situation *in vivo*, ce signal est transmis à la cellule lorsqu'elle reconnaît le fragment antigénique présenté par la molécule du CMH sur une cellule présentatrice d'antigène à travers le récepteur TCR.

En situation *in-vitro*, les LT sont activés de façon polyclonale en utilisant soit des anticorps anti-CD3 solubles ou bien des anticorps CD3 et CD28 immobilisés. Les anticorps anti-CD3 immobilisés favorisent une meilleure liaison qui entraîne l'activation tandis que les anticorps anti-CD28 activent les voies de co-stimulation. Une alternative consiste à utiliser des billes paramagnétiques telles que les Dynabeads™ : ce sont des billes revêtues de ces anticorps qui, lorsqu'elles sont en suspension, vont fournir une stimulation des LT plus conséquente. (15,16)

Une alternative récente consiste à utiliser des réactifs de stimulations, qui intègrent des anticorps humanisés dirigés contre CD3 et CD28 conjugués à une nanomatrice de polymère colloïdal. La nanomatrice est éliminée facilement lors de la centrifugation. Encore plus récemment, d'autres approches sont en développement notamment l'utilisation de microsphères dissolvables. (14,17)

c. Transduction des lymphocytes T en CAR-T cell

La transduction des LT constitue une étape essentielle dans l'ingénierie des CAR-T cell. Il s'agit d'un processus visant à conférer aux LT la capacité de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses. Cette étape basée sur l'introduction d'un vecteur viral porteur du transgène CAR dans les LT permet la modification génétique nécessaire pour conférer aux LT une nouvelle fonctionnalité anticancéreuse.(14)

Les CAR-T cell commerciales ainsi que la plupart des CAR-T cell destinées aux essais cliniques utilisent des vecteurs viraux en particulier ceux basés sur les *Retroviridae*, tels que les rétrovirus et les lentivirus dans le but de modifier le génome. Ces agents viraux sont utilisés car ils permettent la rétrotranscription de leurs ARN viral en ADN, qui est par la suite intégré de manière stable au génome de la cellule hôte. Cette intégration permet l'expression durable du transgène CAR. Les rétrovirus se distinguent par leur

compétence à transcrire leur génome dans des cellules en phase de division, facilitant ainsi leur utilisation dans la transduction des LT proliférants. À l'inverse, les lentivirus, en particulier les lentivirus dérivés du VIH possèdent la capacité unique d'infecter des cellules non divisées : une caractéristique pertinente pour cibler les LT au repos. (14,18,19)

Les rétrovirus utilisés à des fins cliniques ont été génétiquement modifiés pour ne plus exprimer les gènes essentiels à leur propre réplication (à savoir gag, pol et env). Cette modification spécifique empêche la production active de virus mais permet la synthèse de particules virales capables de pénétrer dans les cellules ciblées. Ces rétrovirus sont donc qualifiés de non-réplicatifs car ils ne sont pas capables d'infecter d'autres cellules de manière efficace. Des contrôles rigoureux sont mis en place pour minimiser le risque résiduel de réactivation de virus réplicatifs. Aux États-Unis, la Food and Drug Administration (FDA) impose une surveillance stricte sur une période de 15 ans pour les patients ayant reçus ce type de traitement.(14,19)

Une autre méthode consiste à utiliser le système transposon. Un transposon, également appelé gène sauteur, est une séquence d'ADN capable de se déplacer de façon autonome dans un génome par un mécanisme nommé transposition qui utilise une enzyme spécifique : la transposase. Il existe notamment les transposons SleepingBeauty ou PiggyBac. L'ADN emballé dans ces vecteurs transposons est transféré au LT par électroporation. Cette méthode induit une perturbation transitoire de la membrane cellulaire à l'aide de champs électriques autorisant l'entrée du matériel génétique sans recourir à des vecteurs viraux. Ces techniques sont utilisées dans le cadre d'essais cliniques ou précliniques et présentent, elles aussi, certains défauts dont la complexité du processus et une faible efficacité de l'expression de CAR.(14,18)

L'efficacité de la transduction dépend de plusieurs paramètres : notamment la concentration virale, le temps d'exposition, et les conditions de culture cellulaire. L'optimisation de ces paramètres vise à maximiser le taux de transduction tout en maintenant la viabilité et la fonctionnalité des LT modifiées. Après la transduction, les cellules modifiées doivent être sélectionnées pour identifier et éliminer celles qui n'ont pas intégrées le transgène. Cela peut être réalisé en utilisant des marqueurs de sélection ou des techniques de tri cellulaire. (11,14)

d. Expansion

Une fois la transduction du CAR réussi, les CAR-T cell sont ensuite cultivées *in-vitro* afin d'avoir une prolifération massive des cellules. Cette étape est indispensable pour obtenir le nombre suffisant de CAR-T cell pour leurs applications cliniques. L'expansion des CAR-T cell peut être effectuée à partir de T-Flasks, qui sont des récipients de culture cellulaire en forme de T adapter à des échelles de laboratoire,

et de sacs de culture statiques, des contenants flexibles hermétiques conçus pour une expansion à plus grande échelle. Alternativement, cette étape peut également être réalisée à l'aide de bioréacteurs à mouvements de bascule, des systèmes plus sophistiqués qui fournissent un environnement de culture contrôlé pour une expansion cellulaire plus importante et régulée. (14,16)

Toutefois, le choix du milieu de culture varie lui aussi en fonction des sites de production. La composition la plus fréquemment observée est une formulation sans sérum accompagnée de cytokines avec les interleukines 2 (IL-2), interleukines 7 (IL-7) et l'interleukine 15 (IL-15). (20)

e. Contrôles

Les CAR-T cell se présentent en poche congelée, et sont administrées par voie intraveineuse. Il s'agit d'un médicament non stérilisable par méthodes finales : le procédé de fabrication doit donc être réalisé dans des conditions aseptiques strictes, afin d'éviter toutes contaminations et de respecter les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF). C'est pour cela qu'il est réalisé dans une Zone à Atmosphère Contrôlée (ZAC) et qu'un système qualité exigeant est nécessaire. Les tests de contrôle qualité comprennent la vérification de la stérilité, de l'identité, de la spécificité et de la puissance de chaque CAR-T cell. Parmi ces paramètres, ce sont les tests de stérilité qui prennent le plus de temps. La majorité des fabricants caractérisent les CAR-T cell grâce à la cytométrie en flux. Différents marqueurs peuvent être utilisés notamment le nombre total de LT via l'expression de CD3, la caractérisation des sous-populations CD4 et CD8, la détection de cellules transduites ou non. Il n'existe aucun consensus qui permet de prédire l'activité du CAR-T cell produit. (14,21)

f. Administration au patient

Le processus de fabrication et d'expédition prend au minimum 3 semaines, ce qui rend nécessaire la mise en place d'une chimiothérapie d'attente, également connue sous le nom de « thérapie bridge », dans le but de mieux traiter la maladie. La chimiothérapie permet également le conditionnement du patient, c'est-à-dire, éradiquer les Treg et les MDSC ; augmenter les cytokines IL-2, IL-7 et IL-15 ; l'induction de molécules co-stimulatrices et activer le système immunitaire inné. Ainsi, le conditionnement du patient contribue une expansion optimale des CAR-T cell une fois administrées.(20)

La chimiothérapie de déplétion a lieu 5 à 6 jours avant l'injection du traitement. Les CAR-T cell sont administrées par voie intraveineuse avec un débit de perfusion de 10 à 20 mL/min. Après traitement, le patient est hospitalisé 2 semaines, délai qui peut être rallongé en cas d'effets indésirables.(11)

g. Traitement avec approches allogéniques

La production de CAR-T cell autologues reste longue et complexe entraînant des coûts élevées et des retards potentiels dans la disponibilité du traitement. L'efficacité des CAR-T cell peut pareillement être limitée par l'épuisement des cellules. Afin de simplifier la production de CAR-T cell, d'importants efforts ont été déployés afin de produire des CAR-T cell allogéniques c'est-à-dire « universelles ». Ces cellules proviennent de donneurs sains ce qui laisse place à une meilleure qualité au départ (pas de cellules tumorales, pas de chimiothérapies) par rapports aux CAR-T cell produites à partir de patients malades. Les CAR-T cell « Off the shelf » sont prêtes à l'emploi et permettent d'éviter des retards, d'augmenter l'uniformité des produits et d'élargir l'accès au traitement. Afin d'industrialiser le processus, de grands bioréacteurs à cuves agitées avec une plateforme à haut débit ont été développés. (14)

Les procédés de production (*figure 6*) restent similaires à celle des CAR-T cell autologues mais diffèrent toutefois en certains points. Les mêmes étapes sont utilisées pour la sélection, l'activation, et le génie génétique. Cependant, les CAR-T cell obtenues sont multipliées en plus grand nombre lors de l'étape d'expansion permettant ainsi de traiter un grand nombre de patients à partir d'un donneur sain.

Afin de permettre aux CAR-T cell universelles d'atteindre leurs pleins potentiels dans un contexte allogénique, il est essentiel d'éviter deux phénomènes indésirables et potentiellement dangereux. Le plus important est le risque d'allo-rejet, c'est-à-dire, le rejet par le système immunitaire du receveur des cellules perfusées. Et dans certains cas, le risque du développement de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD). Ce phénomène se déclenche lorsque les LT activés du donneur attaquent les cellules épithéliales de l'hôte en réaction à une série d'événements inflammatoires qui produisent notamment une libération excessive de cytokines (exemple $TNF\alpha$ et $IFN\gamma$). Actuellement, il reste incertain si l'administration de CAR-T cell allogéniques comporte un risque de réaction GVHD. (22)

Pour pallier ces risques, des techniques d'édition du génome ont vu le jour telles que CRISPR-Cas9 « Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats », nucléases à doigts de zinc (ZFN) ou encore la technologie TALEN « Transcription Activator-Like Effector Nuclease » afin de désactiver temporairement ou de manière permanente l'expression du récepteur $\alpha\beta$ des LT (TCR $\alpha\beta$) dans les cellules (comme on peut le voir lors de l'étape supplémentaire après la transduction des LT et CAR-T cell sur la *figure 6*). Actuellement, les CAR-T allogéniques ont été soumises à des essais cliniques et les résultats récents ont montré des rémissions chez des patients atteints de leucémie aiguë lymphoblastique de type B réfractaire. Malheureusement, la technique n'est pas encore totalement au point car la persistance des CAR-T cell allogéniques est plus courte que celle des approches autologues. (14)

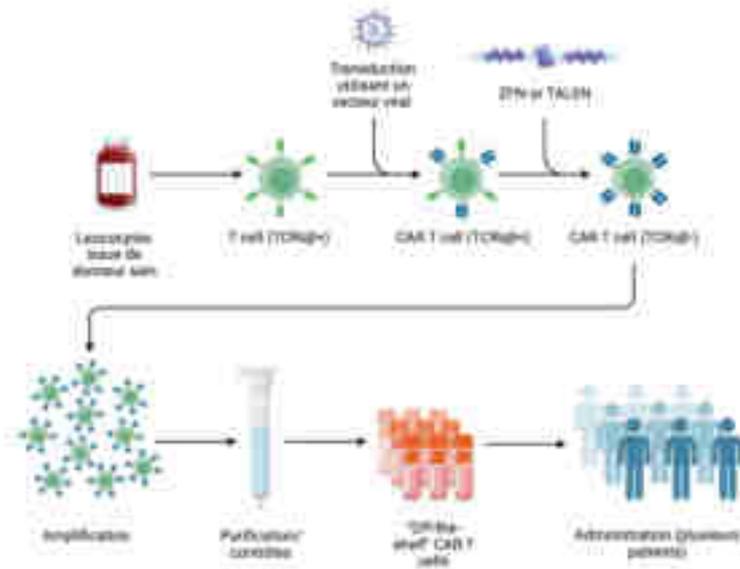


Figure 6 Étapes de production CAR-T cell avec approche allogénique (14)

(1) Prélèvement des globules blancs en ambulatoire issus de donneur sain. (2) En laboratoire, les lymphocytes sont génétiquement modifiés pour devenir des CAR-T cell (3) Régulation de l'expression des récepteurs à l'antigène du lymphocyte T (TCR) à l'aide de Zinc Finger Nuclease (ZFN) ou Transcription Activator-Like Effector Nuclease (TALEN) (4 et 5). Les cellules sont ensuite amplifiées et contrôlées. (6) Les CAR-T cell « off the shelf », c'est-à-dire universelles, sont prêtes à être administrées (Schéma réalisé à partir de Biorender).

5) Indications

Il y a plus de dix ans, des essais cliniques précoces chez des patients atteints de tumeurs malignes à cellules B en rechutes et/ou réfractaires (R/R) ont montré que les CAR-T cell ciblant le CD19 (une protéine présente sur les cellules B malignes) étaient efficaces. Ces essais ont révélé des taux de réponse complète (RC) allant de 40% à 74% chez des patients atteints de différents types de lymphomes en rechute. Les CAR-T cell ont été approuvées par la FDA pour le traitement des lymphomes à cellules B en R/R, ainsi que pour la LAL à cellules B R/R. Plus récemment, les CAR-T cell ciblant l'antigène BCMA ont atteints des taux de réponse de 73% à 98% chez les patients atteints de myélome multiple en rechute. Les CAR-T cell sont désormais approuvées par la FDA pour le traitement du myélome multiple (MM) en rechute, même chez les patients qui ne répondent plus à d'autres traitements ciblés.(23)

a. Lymphome à cellules B et leucémie

Tout d'abord, les lymphomes et les leucémies sont regroupés car les CAR-T cell indiquées dans ces pathologies ciblent le CD19 présent sur les LB. Un lymphome est un type de cancer qui se développe à partir des cellules du tissu lymphoïde. On distingue les lymphomes hodgkiniens des lymphomes non-hodgkiniens qui sont les lymphomes les plus fréquents. Les lymphomes non-hodgkiniens sont au 6^{ème}

rang des cancers en France avec la survenue de 17 000 nouveaux cas par an avec une augmentation constante de leur incidence.(24)

Lymphomes diffus à grandes cellules B

Les lymphomes diffus à grandes cellules B représentent la majorité des cas de lymphomes non-hodgkiniens, soit environ 35 % de tous les cas et se caractérisent par une présentation clinique agressive. Lors d'une biopsie des ganglions lymphatiques, on observe une forte prolifération de grandes cellules, se multipliant de manière significative, ce qui perturbe la structure normale du ganglion. Le traitement de ces lymphomes repose généralement sur une approche de polychimiothérapies, fréquemment avec le protocole CHOP qui combine plusieurs médicaments de chimiothérapie (dont cyclophosphamide, doxorubicine et vincristine) en association avec des anticorps monoclonaux ciblant la protéine CD20.(24)

Lymphomes folliculaires

Les lymphomes folliculaires (LF) sont le deuxième sous-type le plus courant des lymphomes non-hodgkiniens, représentant environ 25 % de tous les cas de lymphomes. Sur le plan clinique, ils ont généralement une évolution lente avec une médiane de survie actuellement supérieure à 15 ans. L'examen de la biopsie ganglionnaire révèle une prolifération d'architecture nodulaire, avec les cellules se développant à partir du centre germinatif des ganglions. Le traitement de ces lymphomes repose également sur une approche de polychimiothérapies, fréquemment avec le protocole CHOP.(24)

Les lymphomes de la zone du manteau

Les lymphomes de la zone du manteau représentent entre 3 et 10 % de l'ensemble des lymphomes non-hodgkiniens et se développent à partir de la zone du manteau des ganglions lymphatiques. L'examen cytologique révèle la présence de petites cellules B, parfois avec des variantes de plus grande taille. Ces lymphomes ont souvent des atteintes disséminées, touchant à la fois les ganglions lymphatiques et d'autres sites dans le corps, notamment : le système digestif, la moelle osseuse et le sang. Le pronostic de ces lymphomes est généralement défavorable, ce qui implique la nécessité de recourir à des protocoles de chimiothérapies intensives pour le traitement des patients atteints par ce type de lymphomes. (24)

Leucémie lymphoblastique

Les leucémies aiguës sont un groupe de cancers du sang caractérisés par la prolifération incontrôlée de cellules sanguines immatures appelées blastes, qui restent bloquées à un stade précoce de leur développement. On distingue principalement deux types de leucémies aiguës : les leucémies aiguës myéloïdes et les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL). Les LAL sont principalement observées chez les enfants, bien que leur incidence puisse également augmenter chez les adultes après l'âge de 50

ans. La LAL représente environ un tiers de tous les cancers chez les enfants. Le traitement des leucémies aiguës implique généralement l'utilisation de polychimiothérapies, qui combine plusieurs médicaments de chimiothérapie. Dans certains cas, une greffe de cellules souches hématopoïétiques peut être nécessaire pour rétablir une moelle osseuse saine.(24)

b. Les CAR-T cell indiquées dans les lymphomes à cellules B et leucémie en France

Les CAR-T cell citez ci-dessous possèdent toutes une autorisation de mise sur le marché (AMM) fournit par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM). Il s'agit d'une thérapie innovante, ainsi certaines indications sont des Autorisations d'Accès Précoces post-AMM (AAP). Les AAP permettent de simplifier et d'accélérer l'accès à l'innovation pour les médicaments qui sont désignés pour traiter des pathologies rares, graves, ou invalidantes et qui n'ont pas d'alternatives tout en garantissant la sécurité du patient. Le dispositif AAP concerne des médicaments innovants et autorise leur utilisation et leur financement à une phase précoce de leur développement, avant même l'obtention de l'AMM, ou en attendant leur inscription au remboursement après l'obtention de l'AMM. Cette autorisation est délivrée par la Haute Autorité de Santé (HAS), suite à l'avis de l'ANSM, pour les médicaments qui n'ont pas encore obtenu l'AMM pour l'indication spécifique en question.(25)

Axicabtagene ciloleucel ($0,4-2 \times 10^8$ cellules) *structure sur la figure 7*, Yescarta® (Gilead Science) est recommandé dans le traitement :

- Adultes qui atteints de lymphome diffus à grandes cellules B ou de lymphome à cellules B de haut grade qui ont connu une récurrence dans les 12 mois suivant la fin de leur première série de traitement ou qui ont été réfractaires au traitement initial (AAP renouvelée le 27/07/2023) ;
- Adultes atteints de lymphome diffus à grandes cellules B ou de lymphome médiastinal primitif à grandes cellules B qui sont réfractaires ou qui connaissent une rechute après avoir suivi au moins deux lignes de traitement systémique (AAP octroyée 16/02/2023) ;
- Adultes souffrants de LF qui ont connu une récurrence après avoir suivi au moins trois lignes de traitements systémiques (AAP octroyée 06/04/2023) (25,26).

Tisagenlecleucel ($1,2 \times 10^6 - 6 \times 10^8$ cellules) *structure sur la figure 7*, Kymriah® (Novartis), est indiqué dans le traitement :

- Des enfants et jeunes adultes (jusqu'à 25 ans) atteints de LAL à cellules B réfractaires et en rechute après greffe ou après la deuxième rechute ou plus ;
- Adultes atteints de lymphome diffus à grandes cellules B R/R après la deuxième ligne ou plus d'un traitement systémique ;
- Adultes atteints de LF en R/R après la deuxième ligne ou plus d'un traitement systémique (AAP renouvelée 06/07/2023) (25,27).

Axicabtagene ciloleucel et tisagenlecleucel ont obtenu une autorisation de mise sur le marché par l'EMA et l'ANSM en septembre 2018. (28)

Brexucabtagene autoleucel (0,4 à 2×10^8 cellules) *structure sur la figure 7*, Tecartus[®](Gilead Science), est indiqué pour le traitement :

- Des patients adultes atteints de lymphome à cellules du manteau R/R après au moins deux lignes de traitements systémiques, dont un traitement par un inhibiteur de tyrosine kinase de Bruton ;
- Des patients adultes âgés de 26 ans et plus atteints de LAL à cellules précurseurs B R/R (25,29).

Son autorisation de mise sur le marché a été autorisée par l'EMA et l'ANSM en décembre 2020. (28)

Lisocabtagene maraleucel (1,1 à 70×10^6 cellules) *structure sur la figure 7*, Breyanzi[®] (Bristol Myers Squibb), est indiqué dans le traitement :

- Lymphome diffus à grandes cellules B chez l'adulte, lymphome de haut grade à cellules B ou d'un lymphome médiastinal primitif à grandes cellules B, R/R dans les 12 mois suivant un traitement de première ligne (AAP renouvelée le 07/09/2023) ;
- LF en R/R chez l'adulte, traitement de 2e intention (AAP octroyée le 07/09/2023) (25).

Son autorisation de mise sur le marché a été autorisée par l'EMA et l'ANSM en avril 2022.(28)

Comme on peut le voir sur la *figure 7*, les quatre CAR-T cell indiquées dans les lymphomes à cellules B et leucémies ciblent le même domaine de liaison à l'antigène CD19. L'anti-CD19 est un fragment variable à chaîne unique dérivé de l'anticorps monoclonal FMC63 de la souris. Les CAR Axicabtagene ciloleucel et Brexucabtagene autoleucel utilisent ce même CAR, mais se distinguent par leur processus de fabrication. La production de Brexucabtagene autoleucel comporte une étape supplémentaire visant à éliminer les cellules malignes du produit de leucaphérèse. Tisagenlecleucel se distingue par sa structure composée de domaines charnières et transmembranaires différents, ainsi que par l'utilisation d'un domaine 4-1BB pour la costimulation au lieu du domaine CD28. Lisocabtagene maraleucel, quant à lui, est administré avec une proportion spécifique de LTCD4⁺ CD8⁺. Les gènes CAR pour Axicabtagene ciloleucel et Brexucabtagene autoleucel sont introduits à l'aide d'un gammaretrovirus, tandis que ceux pour Tisagenlecleucel et Lisocabtagene maraleucel sont délivrés à l'aide de lentivirus.(23)

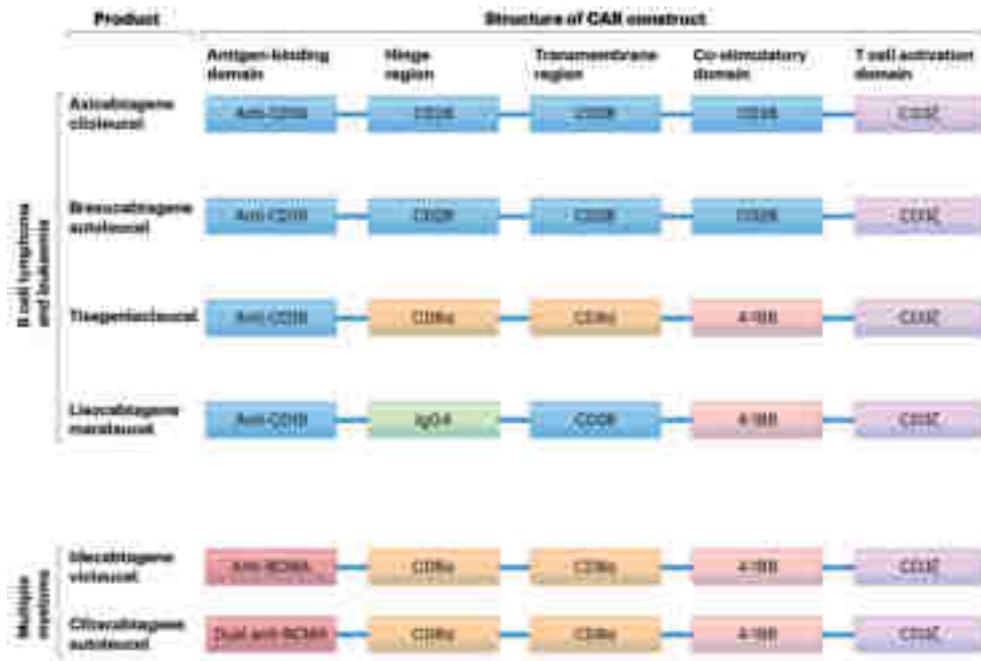


Figure 7 Structure du CAR (R ccepteur chimérique à l'antigène) des CAR-T cell approuvées par la FDA (Food and Drug Administration) (23)

Les CAR-T cell sont destinées aux patients atteints de lymphomes à cellules B et leucémies et aux patients atteints de myélome multiple (MM). Tous ces produits sont dits de deuxième génération et présentent une structure CAR comprenant un domaine de liaison à l'antigène, une région charnière, une région transmembranaire, un domaine de co-stimulation et un domaine d'activation des cellules T. Tous les CAR ciblant le CD19 contiennent le même domaine de liaison à l'antigène. Idecabtagene vicleucel comprend un fragment variable à chaîne unique de souris ciblant l'antigène de maturation des cellules B (BCMA). Ciltacabtagene autoleucel possède un domaine de liaison composé de deux domaines de liaison à l'antigène de camélidés   chaîne lourde uniquement (VHH) ciblant l'antigène BCMA.

c. Myélome multiple (MM)

Le MM également connu sous le nom de maladie de Kahler, est une forme de cancer sanguin caractérisé par la prolifération de plasmocytes tumoraux dans la moelle osseuse. Le plasmocyte découle de la maturation du LB et son rôle principal est la production d'anticorps. Cette maladie représente environ 1% de tous les cancers et 10 % de tous les cancers du sang, avec environ 5 000 nouveaux cas diagnostiqués chaque année en France. L'incidence du MM augmente avec l'âge et est diagnostiqué chez des individus d'environ 70 ans. La médiane de survie est proche de 10 ans.

Le traitement du MM est composé de périodes de rémission (appelées phases de plateau) suivies de rechutes. Le traitement est réservé aux cas actifs, qu'ils présentent ou non des symptômes. Il repose dans un premier temps sur l'utilisation de chimiothérapies conventionnelles (exemple agent alkylant comme melphalan), d'inhibiteurs du protéasome (exemple bort zimib), d'agents immunomodulateurs (exemple thalidomide), d'anticorps monoclonaux anti-CD38. (24)

d. Les CAR-T cell indiquées dans les myélomes multiples en France

Actuellement, l'antigène de maturation des cellules B (BCMA) est devenu la cible la plus efficace pour la thérapie par CAR-T cell dans le traitement du MM. Jusqu'à présent, deux produits CAR-T cell ciblant le BCMA, à savoir l'Idecabtagene vicleucel et le Ciltacabtagene autoleucel ont été approuvés par la FDA.(23)

Idecabtagene vicleucel (260 à 500 x 10⁶ cellules) *structure sur la figure 7*, Abecma[®] (Bristol Myers Squibb) est indiqué dans le traitement des patients adultes atteints d'un MM en R/R pour les patients ayant reçus au moins trois traitements antérieurs et dont la maladie a progressé lors du dernier traitement.(30)

Son autorisation de mise sur le marché a été autorisée par l'EMA et l'ANSM en septembre 2023. (28,31)

Ciltacabtagene autoleucel (3,2x10⁶ à 1,0x10⁸ cellules) *structure sur la figure 7* Carvykti[®] (Janssen Cilag) possède la même indication que Idecabtagene vicleucel. Il a obtenu une autorisation de mise sur le marché par l'EMA et l'ANSM en juin 2022. Cependant l'AAP n'a pas été renouvelée en septembre 2023 par la HAS et l'ANSM. (25,28)

La Commission européenne a autorisé ces CAR-T cell avec la mise en place de mesures additionnelles de réduction des risques afin de réduire les risques et de garantir l'efficacité du traitement. (28)

6) Effets Indésirables des CAR-T cell

Malgré le succès des CAR-T cell sur le plan clinique, leur utilisation peut engendrer d'importantes toxicités qui sont directement liées à l'activation de réponses immunitaires. Deux effets secondaires majeurs ont été observés lors des essais cliniques : il s'agit du syndrome de libération de cytokines (CRS pour *Cytokine release syndrome*) et du syndrome de neurotoxicité associé aux cellules effectrices immunitaires (ICANS pour *immune cell-associated neurotoxicity syndrome*), souvent désigné sous le terme de neurotoxicité. C'est pour cela que leur administration doit être assurée dans un établissement de santé qualifié. (32)

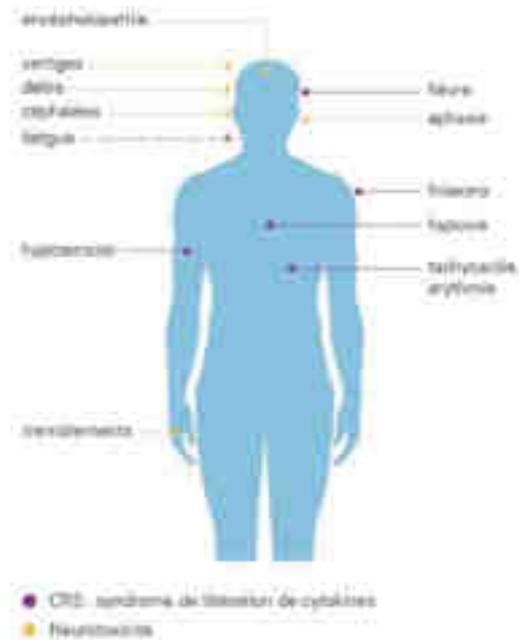


Figure 8 Effets indésirables les plus fréquents et leurs symptômes lors de traitement par CAR-T cell (6)

a. Syndrome de relargage des cytokines

La fréquence et la sévérité du CRS varie entre 37-97 % tout grade confondu et de 1- 23 % pour les cas sévères (11). Le CRS débute couramment avec de la fièvre et des symptômes généraux (*identifiés en violet sur la figure 8*). Dans les cas les plus sévères, le CRS peut se manifester par d'autres signes témoignant une réaction inflammatoire à l'échelle du corps, tels que l'hypotension, l'hypoxie, et/ou un dysfonctionnement des organes.

La physiopathologie du CRS peut être divisée en cinq phases principales qui sont représentées chronologiquement à l'injection sur la *figure 9*. La phase 1 débute par le déplacement des CAR-T cell vers les cellules malignes après leurs injections et leur reconnaissance des cellules cibles exprimant l'antigène du récepteur CAR. En phase 2, on observe la prolifération des CAR-T cell, la production locale de cytokines par les CAR-T cell activées ainsi que par les composants cellulaires locaux. Cette phase est également caractérisée par l'activation des cellules immunitaires endogènes dites "bystander" (par exemple : les macrophages). La phase 3 se caractérise par une augmentation des niveaux de cytokines et une expansion des populations de CAR-T cell dans le sang périphérique, ce qui déclenche une réponse inflammatoire systémique. Cette réaction entraîne des lésions endothéliales et des fuites vasculaires dans de nombreux tissus et organes, provoquant des conséquences telles que l'hypoxie et/ou des lésions au niveau des organes. Lors de la phase 4, les cytokines diffusent et les CAR-T cell, les LT endogènes et les monocytes activés migrent vers la périphérie. Cela peut coïncider avec la rupture de la barrière hémato-encéphalique (BHE) associée à l'apparition de neurotoxicité (*effets indésirables détaillés dans la partie suivante*).⁽³²⁾

Le profil de cytokines observé dans le CRS (*figure 9*) est le résultat de l'activation de nombreuses cellules immunitaire plutôt qu'une interaction simple observée entre les cellules cibles et les CAR-T cell. L'interleukine-6 (IL-6), libérée par les macrophages et les monocytes activés, semble jouer un rôle essentiel dans la mise en place du CRS et possède des concentrations plus élevées dans les cas graves. L'interleukine-1 (IL-1) est libérée par les mêmes cellules et stimule la production d'IL-6. D'autres cytokines sont libérées par les CAR-T, LT ou cellules myéloïdes activées tels que l'interleukine-2 (IL-2), l'interleukine-8 (IL-8), l'interleukine-10 (IL10), le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α), l'interféron gamma (IFN- γ), la protéine chimioattractante monocyttaire-1 (MCP-1). Dans les cas sévères, on observe une augmentation des taux de granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF).(32)

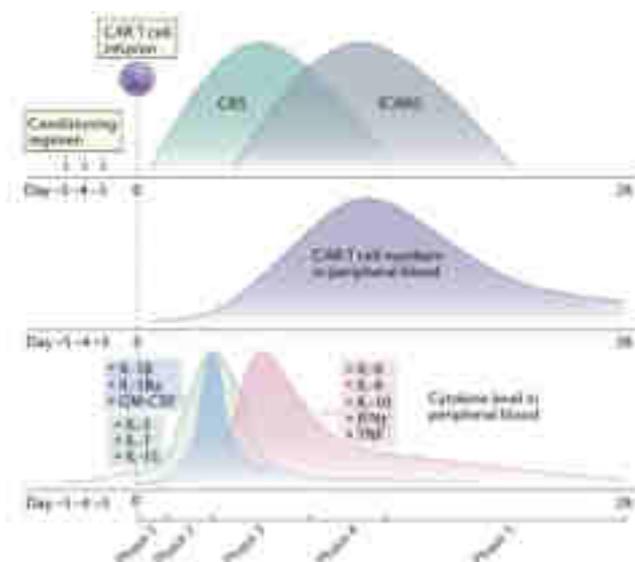


Figure 9 Schéma chronologiques de l'apparition des effets indésirables majeurs des CAR-T cell : syndrome de relargages des cytokines (CRS) et neurotoxicité (ICANS) ainsi que les niveaux de cytokines exprimées (32)

La cinétique de prolifération et les taux de cytokines dans le sang périphérique ont été étudiés chez des patients atteints de lymphomes ou de leucémies qui ont reçu une chimiothérapie de conditionnement avant la perfusion de CAR-T cell ciblant le CD19 le jour 0. Le CRS se manifeste généralement au cours de la première semaine suivant la perfusion. L'ICANS se développe au cours de la deuxième semaine après la perfusion. Les CAR-T cell atteignent leurs pics dans le sang périphérique une à deux semaines après la perfusion. Après la chimiothérapie de conditionnement, les niveaux de cytokines homéostatiques (exemple IL-2, l'IL-7 et l'IL-15) augmentent en raison de la lymphodéplétion et de l'élimination des réservoirs de cytokines. Une augmentation supplémentaire des niveaux de cytokines est observée après la perfusion de CAR-T cell afin de permettre leur survie et prolifération. Les niveaux d'IL-1 β et de son antagoniste naturel, l'agoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1Ra), ainsi que GM-CSF, atteignent généralement leurs pics plus tôt que d'autres cytokines pro-inflammatoires. Les IL-6, IL-8, IL-10 IFN γ TNF- α arrivent plus tard dans la réaction. La physiopathologie du CRS peut être divisée en cinq phases principales.

CRS Parameter	Grad 1	Grad 2	Grad 3	Grad 4
Fever	Fever $\geq 38.5^{\circ}\text{C}$ (not attributable to any other cause). In patients who have CRS then receive antipyretics or antibiotic therapy such as benzocaine or steroids, fever is no longer required to grade subsequent CRS severity. In this case, CRS grading is driven by hypotension and/or hypoxia.			
Hypotension	None	Not requiring vasopressors	Requiring a vasopressor with or without vasopressin	Requiring multiple vasopressors (including vasopressin)
Hypoxia	None	Requiring low-flow oxygen (delivered at $\leq 6\text{L/min}$)	Requiring high-flow oxygen (delivered at $> 6\text{L/min}$)	Requiring positive pressure (e.g. CPAP, BiPAP, intubation and mechanical ventilation)

Figure 10 Grade syndrome de relargages des cytokines (CRS) réalisé par the *European Society of Blood and Marrow Transplantation (EBMT)* et the *European Hematology Association (EHA)* (11)

b. Neurotoxicité

Le deuxième effet indésirable le plus important est le syndrome de neurotoxicité associée aux cellules effectrices immunitaires (ICANS). Il apparaît chez 20-30 % des patients parmi lesquels 12 à 30 % développent des symptômes graves. (11) Il se manifeste généralement par une encéphalopathie dont les symptômes sont les suivant : confusion, aphasia, problèmes de coordination fine des mouvements et une somnolence (*identifiés en jaune sur la figure 8*). Dans les cas les plus graves, on observe des crises d'épilepsie, une faiblesse musculaire, un œdème cérébral et parfois même le coma. La majorité des patients qui développent de l'ICANS ont été affectés par le CRS. Les symptômes apparaissent 4-5 jours (*figure 9*) après le traitement et durent en moyenne 5 -10 jours. On peut considérer le CRS comme un déclencheur ou un facteur contribuant à la neurotoxicité. Les facteurs de risques sont : une morbidité avancée, un âge avancé et le produit CAR-T cell spécifique. (11,33)

Les symptômes cliniques sont facilement identifiables cependant la phytopathologie elle reste encore incomprise. Des modèles précliniques récents suggèrent que l'activation des cellules endothéliales et la perturbation de la BHE peuvent entraîner des lésions directes des cellules neuronales. En combinant ces données avec les résultats issus des essais cliniques, il semblerait que la physiopathologie de l'ICANS présente des similitudes avec celle du CRS. Elle semble débiter par la production de cytokines pro-inflammatoires par les CAR-T cell et par l'activation des cellules immunitaires périphériques. Les cytokines et chimiokines inflammatoires produites se propagent dans la circulation sanguine. Ces substances pro-inflammatoires finissent par endommager la BHE ce qui entraîne une accumulation de cytokines et de CAR-T cell dans le système nerveux central (SNC). Les cellules microgliales résidentes du SNC se trouvent activées. (32)

Tous les patients doivent être soumis à une surveillance proactive de l'ICANS deux fois par jour afin d'évaluer les changements subtils de la cognition à l'aide du score ICE (Immune Effector Cell Encephalopathy) en 10 points qui évalue l'orientation, l'attention, l'écriture et la langue. Ce score est ensuite intégré dans une évaluation globale de la fonction neurologique (activité épileptique et la pression intracrânienne/œdème cérébral) pour déterminer le grade de l'ICANS. (11)

De même que pour le CRS, l'ICANS est réversible chez la plupart des patients dans les 4 semaines après l'apparition des symptômes. Toutefois, certaines séquelles neuropsychiatriques à long terme ont été décrites. La prise en charge de l'ICANS repose sur la sévérité du score et la présence d'un CRS. Les traitements indiqués pour des cas de faible grade : un bilan diagnostique approfondi est mis en place ainsi que des soins de symptomatiques. Les crises sont traitées avec du lévétiracétam (antiépileptique) et l'état de mal épileptique est géré avec des benzodiazépines. Les cas sévères sont traités par des corticostéroïdes. Bien que le tocilizumab soit hautement efficace dans le CRS, il se révèle généralement inefficace dans la plupart des ICANS. Cette disparité peut s'expliquer par des différences dans les mécanismes physiopathologiques ainsi que par des limitations quant à la capacité du tocilizumab à franchir la BHE. En revanche, les données concernant l'effet des corticoïdes sur l'efficacité des CAR-T cell sont contradictoires. Certaines études ne montrent aucun impact, tandis que d'autres indiquent des résultats cliniques défavorables, notamment un risque accru de progression précoce et de décès.(32,33)

c. Autres toxicités

Aplasie des cellules B et hypogammaglobulinémie

Les CAR-T cell qui ciblent les antigènes de surface des cellules B, tels que CD19 ou CD22 entraînent la destruction des cellules B malignes et saines, ce qui peut entraîner une diminution des niveaux d'anticorps dans le corps, augmentant le risque d'infections. La surveillance de l'aplasie des LB offre des informations importantes sur deux aspects du traitement. Tout d'abord, il s'agit d'un indicateur de la persistance fonctionnelle des CAR et peut souvent révéler une persistance plus longue que la détection directe des CAR-T cell elles-mêmes. Elle permet, également, d'orienter les décisions concernant la fréquence de suivi de la maladie et la nécessité d'une transplantation de cellules souches hématopoïétiques allogéniques en cas d'échec des CAR-T cell.(11)

L'évaluation approfondie de l'aplasie des LB et des taux d'IgG est essentielle après administration du traitement afin de prévenir les infections aiguës et chroniques, fournir un traitement approprié en cas d'infections, éviter les dommages aux organes causés par des infections silencieuses ainsi qu'améliorer la qualité de vie du patient. Afin de limiter les risques peut être substitué en intraveineuse ou sous-cutanée. (11)

Myélotoxicité et infection

La toxicité hématologique est un des effets indésirables le plus courant après une thérapie par CAR-T cell. Les facteurs de risque de la toxicité hématologique comprennent : CRS ou ICANS, la présence de cytopénie avant le traitement CAR-T et une greffe de cellules souches allogéniques antérieures et à des risques de complications infectieuses graves. L'immunosuppression post-traitement est souvent multifactorielles (exemple : neutropénie, lymphopénie). Les patients atteints d'une réponse complète sans syndrome myélodysplasique ont montré une cytopénie significative persistante jusqu'à 22 mois après le traitement par CAR-T cell.(11)

7) Les essais cliniques portant sur des CAR-T cell

L'efficacité des CAR-T cell dans les hémopathies malignes nécessite encore quelques améliorations afin d'amplifier le taux de réponse au traitement et de réduire les taux de rechute. De plus, les CAR-T cell ne sont pas encore adaptées aux cancers hématologiques des LT, aux hémopathies malignes de types myéloïdes ni aux tumeurs solides. Dans ce cadre-là, 1205 essais cliniques ont été enregistrés en janvier 2023. La plus grande fraction concerne des essais cliniques en phase de développement précoce (phase I essentiellement) accompagnés de six essais cliniques en phase II/III et sept en phase III. Ces essais cliniques sont principalement dirigés par des groupes américains et chinois, avec seulement 61 étant menés par des groupes européens. Concernant les essais cliniques européens, 50 portent sur les hémopathies malignes et 11 sur les tumeurs solides. Deux initiatives ont été lancées récemment pour favoriser la collaboration et accroître l'activité CAR-T cell en Europe : GoCART et le consortium T2 EVOLVE. Plus de 250 essais cliniques internationaux utilisent les CAR-T Cell dans les tumeurs solides. L'arrivée des CAR-T cell dans les tumeurs solides fait suite au succès obtenu dans les hémopathies malignes où les CAR-T cell ont permis d'obtenir des taux de rémissions durables et persistantes.(11,34)

III. Les Car-T cell dans les tumeurs solides

Dans un premier temps, il est nécessaire de différencier les tumeurs solides des tumeurs liquides. Les tumeurs liquides se propagent à travers la circulation sanguine, tandis que les tumeurs solides se présentent sous la forme d'une masse unique ou de plusieurs masses constituées d'amas de cellules cancéreuses. Les tumeurs liquides sont donc les cancers du sang et l'unique catégorie de cancers pour laquelle les CAR-T cell sont appliquées en traitement. Du fait de leurs constitutions différentes, il est tout à fait naturel que certaines divergences demeurent concernant leurs applications. Une des différences est notamment liée à la voie d'administration du traitement : pour rappel les CAR-T cell sont administrées par voie intraveineuse. Dans les tumeurs liquides, elles peuvent donc accéder facilement à leurs cibles. Tandis que, dans les tumeurs solides, les CAR-T cell nécessitent d'atteindre leurs sites d'action afin de pouvoir agir correctement. Le microenvironnement tumoral et l'expression d'antigène hétérogène font partie des nombreux challenges liés aux tumeurs solides qui seront abordés dans les détails de cette partie. (35)

1) Les tumeurs solides

Tout d'abord, avant de comprendre les différents challenges de l'application des CAR-T cell, il est important de définir les tumeurs solides et leurs composants.

a. Généralités sur les tumeurs solides

Les tumeurs solides se forment à partir d'une masse compacte de cellules cancéreuses qui peut émerger dans n'importe quelle partie du corps. De nos jours, 90 % des cancers sont des tumeurs solides. De plus, les tumeurs peuvent être caractérisées de malignes ou bénignes : une tumeur maligne est un cancer qui montre une certaine agressivité de par sa capacité d'invasion et de destruction des tissus adjacents. De l'autre côté, les tumeurs bénignes n'ont pas la capacité d'envahir les tissus adjacents et sont généralement résécables par chirurgie.

On distingue deux types de tumeurs solides selon leurs origines :

- Les carcinomes dont les tumeurs sont issues de cellules épithéliales, c'est-à-dire de la peau, des muqueuses et des glandes. Exemple : le cancer du sein et le cancer du poumon.
- Les sarcomes dont les tumeurs sont issues de cellules des tissus conjonctifs. Il s'agit des tumeurs solides les moins fréquemment observées. Exemple : les cancers des os et du cartilage.

Une tumeur n'est pas simplement un groupe de cellules cancéreuses, mais un ensemble hétérogène de cellules hôtes infiltrées et résidentes, de facteurs sécrétés et de matrice extracellulaire. La tumeur est donc accompagnée de son microenvironnement qui lui est propre. (35,36)

b. Le microenvironnement tumoral

Le microenvironnement tumoral (MET) se définit comme l'environnement dans lequel se développe la tumeur. La composition du MET varie selon les tumeurs mais elle regroupe les cellules, les composants de la matrice extracellulaire comme les molécules produites et libérées au niveau de la tumeur (exemple fibres de collagène) et les vaisseaux sanguins. Le MET se compose d'une large population cellulaire comme : les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules immunitaires. Tous les éléments principaux du MET sont rapportés dans *le tableau 1 : composant cellulaire et non cellulaire majeur du microenvironnement tumoral*. Toutes les cellules dites non cancéreuses forment le stroma. Les cellules cancéreuses interagissent constamment avec les cellules du MET. Par exemple, les cellules du MET peuvent libérer des signaux dits pro-tumoraux qui vont permettre la progression du cancer. Ces interactions permettent l'initiation, la progression et les métastases de la tumeur ainsi que la réponse aux thérapies.(37,38)

Tableau 1 Composant cellulaires et non cellulaires majeurs du microenvironnement tumoral (38)

Type de cellules	Fonction dans le microenvironnement tumoral
<i>Cellules de l'immunité adaptative</i>	
Lymphocyte T CD8 + 	Les lymphocytes T CD8 + (LT CD8+) jouent un rôle crucial en tant qu'acteurs puissants de la réponse immunitaire anti-tumorale. Ils ont la capacité de cibler et de détruire spécifiquement les cellules cancéreuses. Dans le contexte des tumeurs, les LT CD8+ présentent souvent un phénotype dysfonctionnel ou épuisé.
Lymphocyte T CD4 + 	Les lymphocytes T CD4+ (LT CD4+) exercent une influence sur diverses cellules immunitaires. Le sous-type Th1 exerce des fonctions anti-tumorales en renforçant les activités des LT CD8+ et des lymphocytes cytotoxiques anti-tumorales. Ils éliminent également les cellules cancéreuses en produisant l'IFN- γ et TNF- α . En revanche, le sous-type Th2 sécrète des médiateurs anti-inflammatoires contribuant ainsi à des fonctions pro-tumorales.
Lymphocyte T régulateur 	Les lymphocytes T régulateurs (Treg) forment une catégorie spécifique de LT CD4+ immunosuppresseurs, agissant comme des régulateurs de l'homéostasie immunitaire. Dans le contexte du cancer, les Treg entravent l'efficacité de l'immunité antitumorale à travers divers mécanismes. Des approches thérapeutiques visant les Treg sont en cours d'étude, mais elles présentent un défi en raison du rôle crucial des Treg dans la prévention de l'auto-immunité.
Lymphocyte B 	Les lymphocytes B (LB) jouent un rôle crucial dans l'immunité humorale, agissant contre les cancers via la cytotoxicité cellulaire, l'activation du complément et la présentation d'antigènes. Présents dans les structures lymphoïdes tertiaires intra-tumorales, les LB activent les LT. Cependant, ils peuvent aussi favoriser la croissance tumorale en l'induisant par la sécrétion de médiateurs pro-angiogéniques et anti-inflammatoires.
<i>Cellules myéloïdes</i>	

<p>Macrophages</p> 	<p>Les macrophages associés aux tumeurs (TAM) sont des cellules immunitaires polyvalentes, possédant des rôles contradictoires dans le cancer. Avec différentes origines, ces cellules coexistent en plusieurs sous-types. Ils peuvent favoriser la croissance tumorale en stimulant l'angiogenèse, en induisant l'immunosuppression, en facilitant la formation de métastases. Cependant, les TAM ont également la capacité de freiner la progression du cancer en phagocytant les cellules cancéreuses ou en activant des réponses immunitaires anti-tumorales.</p>
<p>Neutrophiles</p> 	<p>Les neutrophiles font partie des cellules immunitaires les plus fréquentes dans le sang et sont recrutés au sein des tumeurs primaires. Leurs rôles varient en fonction du MET et de leurs maturations, pouvant avoir des effets antitumoraux ou pro-tumoraux. L'accumulation systémique de neutrophiles contribue à l'immunosuppression et au remodelage de la matrice extracellulaire dans les organes distants du site tumoral, favorisant la formation de niches (pré)métastatiques.</p>
<p>Monocytes</p> 	<p>Les monocytes présents dans le sang mûrissent en macrophages et en cellules dendritiques au niveau des tissus. Composés de sous-types variés, ils jouent des rôles contradictoires dans le cancer allant de la production de médiateurs antitumoraux à l'immunosuppression, au remodelage de la matrice extracellulaire et à d'autres processus favorisant la progression tumorale. Certains monocytes se différencient en TAM soutenant ainsi la croissance tumorale.</p>
<p>Cellules dendritiques</p> 	<p>Les cellules dendritiques (CD) sont des cellules présentatrices d'antigènes qui jouent un rôle essentiel dans l'initiation et la régulation des réponses immunitaires adaptatives. Les tumeurs cherchent à restreindre l'activité des CD pour échapper au contrôle immunitaire.</p>
<p>Éosinophiles</p> 	<p>Les éosinophiles, initialement liés aux allergies et aux infections parasitaires, jouent un rôle complexe dans le MET. En plus de tuer directement les cellules tumorales, ils régulent la vascularisation de la tumeur et influent sur la composition immunitaire du MET, affichant des fonctions à la fois pro- et anti-tumorales selon les signaux.</p>
<p>Cellules suppressives d'origine myéloïde</p> 	<p>Les cellules suppressives d'origine myéloïde (MDSC) forment une population variée de cellules myéloïdes, comprenant des cellules monocytaires et neutrophiles immatures, avec des capacités immunosuppressives puissantes. Leur prolifération est observée chez les patients atteints de cancers et dans les modèles murins de tumeurs, associée à un pronostic clinique défavorable. Les MDSC entravent l'activité des LT, LB et CD par des mécanismes paracrines ou de contact cellule-cellule.</p>
<p>Les plaquettes</p> 	<p>Les plaquettes, ou thrombocytes, sont des fragments de cytoplasme issus des mégacaryocytes de la moelle osseuse. Présents en abondance dans le sang, elles jouent un rôle essentiel dans la coagulation. Les plaquettes favorisent la progression tumorale et la formation de métastases en se liant aux cellules tumorales circulantes les protégeant ainsi du stress physique et des attaques immunitaires. Elles modulent l'angiogenèse et l'intégrité vasculaire en interagissant avec les cellules endothéliales. De plus, les plaquettes</p>

	contribuent à l'inflammation liée à la tumeur et à l'évasion immunitaire en activant les cellules myéloïdes.
Les cellules stromales et matrice extracellulaire	
Les fibroblastes associés au cancer 	Les fibroblastes associés au cancer jouent un rôle central dans le MET. Il existe différents sous-types fonctionnels, démontrant une grande flexibilité. Ils exercent des rôles variés et parfois opposés. Ils façonnent et modifient la matrice extracellulaire impactant ainsi les caractéristiques mécaniques de la MEC et le comportement des cellules cancéreuses et immunitaires. Ils influencent l'angiogenèse, possèdent une forte capacité d'immunomodulation et favorisent l'évasion immunitaire.
Matrice extracellulaire 	La MEC est un élément structurel non-cellulaire du MET, composée de protéines fibreuses telles que le collagène, les glycoprotéines et les protéoglycanes. Dynamique, elle est continuellement remodelée par les protéases produites par diverses cellules dans le MET, avec une composition variant selon le type et le stade de la tumeur. La MEC facilite la communication entre les cellules en stockant des molécules sécrétées et en servant de support pour l'adhésion et la migration cellulaire. Le remodelage de la MEC libère des molécules séquestrées, générant des concentrations locales élevées de médiateurs.
Les Adipocytes 	Présents dans divers tissus, les adipocytes sont spécialisés dans le stockage de l'énergie sous forme de graisse. L'obésité, un important facteur de risque pour plusieurs cancers, met en lumière le rôle émergent des adipocytes associés au cancer. Ces derniers libèrent des composés tels que des acides gras, des hormones, des cytokines et des facteurs de croissance, influençant les cellules cancéreuses et les cellules du MET. Ils contribuent à une inflammation chronique de bas grade, favorable à la progression tumorale, en produisant des signaux d'attraction pour les cellules myéloïdes.
Neurones et nerfs 	Les neurones et fibres nerveuses jouent un rôle dans la tumorigenèse, notamment à travers l'invasion périneurale. Cette interaction implique une signalisation réciproque où les neurones libèrent des substances favorisant la formation de cellules souches cancéreuses, la résistance à l'apoptose et une prolifération accrue. Les nerfs régulent également l'inflammation et la réponse immunitaire dans le MET, constituant un domaine actif de recherche en oncologie.
Cellules vasculaires	
Cellules endothéliales vasculaires 	Les cellules endothéliales forment la paroi des vaisseaux sanguins et présentent une hétérogénéité et une certaine plasticité. Les cellules endothéliales tumorales, distinctes des normales, affichent des niveaux réduits de molécules d'adhésion altérant la fonction barrière, et expriment des molécules inhibitrices du point de contrôle immunitaire, contribuant ainsi à l'immunosuppression.
Cellules endothéliales lymphatiques 	Les cellules endothéliales lymphatiques forment la paroi des vaisseaux lymphatiques, qui, dans le MET, constituent un moyen de dissémination des cellules cancéreuses, en complément des vaisseaux sanguins. Ces cellules ont récemment émergé en tant que régulateurs directs de l'immunité anti-tumorale.

<p>Péricytes</p> 	<p>Les péricytes entourent les vaisseaux sanguins, favorisant leur maturation et perméabilité. Dans les tumeurs, une interaction déficiente avec les cellules endothéliales contribue à la fuite vasculaire. Les péricytes interagissent aussi avec d'autres cellules, modulant le MET, notamment par leurs activités immunomodulatrices.</p>
---	---

c. Système immunitaire et tumeurs solides

La réponse immunitaire face aux cellules cancéreuses fait partie des piliers du développement d'un cancer. Au fur et à mesure des années est apparue l'hypothèse d'un concept suggérant une balance entre les cellules tumorales et immunitaires qui contribue à l'élimination, à un maintien contrôlé ou à la progression des cellules tumorales. Il s'agit du principe d'immunoédition avec la règle des 3 E : élimination, équilibre, échappement (*détaillé figure 11*). Dans le processus d'immunoédition du cancer, la capacité du système immunitaire à surveiller, reconnaître et éliminer les cellules tumorales est cruciale pour restreindre la progression de la maladie.(39)

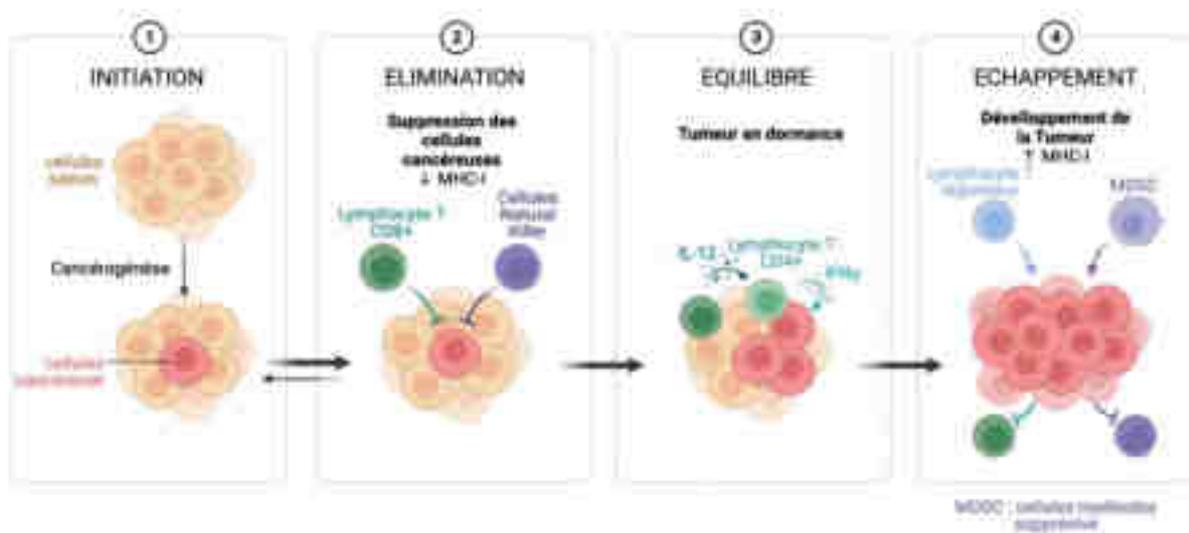


Figure 11 Schéma représentant le principe de l'immunoédition dans le cancer (39)

Selon la théorie de l'immunoédition, on peut identifier trois phases dans les interactions entre le système immunitaire et la tumeur : (1) apparition de la première cellule cancéreuse (2) lors de la phase d'élimination, le système immunitaire (SI) repère et élimine les cellules tumorales malignes ou transformées avant même qu'elles ne soient détectables cliniquement. (3) Lors de la phase d'équilibre, un équilibre relatif entre les cellules tumorales et le SI est mis en place. Le SI ne parvient pas à éliminer complètement les cellules tumorales et celles-ci ne peuvent échapper à la surveillance immunitaire. (4) Lors de la phase d'échappement, la croissance et la prolifération des cellules tumorales ne sont plus limitées par le SI. La rapide multiplication des cellules tumorales, combinée à d'autres cellules stromales, crée un microenvironnement immunosuppresseur complexe, compromettant l'équilibre entre les cellules tumorales et le SI. (*schéma réalisé à partir de Biorender*)

De plus, pour comprendre d'avantage la complexité du paysage immunitaire au sein du MET, il est important de mentionner les points de contrôle immunitaire (PCI) ou *checkpoints* immunitaires. Les PCI sont des mécanismes de régulation de la réponse immunitaire. Ils comprennent des molécules de surface cellulaire telles que PD-1 (*programmed cell death protein-1*), CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*), TIM-3 (*T-cell immunoglobulin and mucin domain containing protein 3*) et LAG-3 (*lymphocyte activation gene 3*). Ces PCI modulent l'activité des LT, évitant ainsi une réponse immunitaire excessive. Cependant, ils peuvent être exploités par les cellules cancéreuses pour échapper à la détection du système immunitaire. Les inhibiteurs de PCI, comme les anticorps anti-PD-1 et anti-CTLA-4, sont utilisés afin de renforcer la réponse immunitaire contre les cellules cancéreuses et améliorer l'efficacité des traitements anticancéreux.(7)

Par ailleurs, l'hétérogénéité des cellules immunitaires infiltrées dans les tumeurs varie d'un patient à l'autre et complexifie la compréhension du rôle de chacun des composants et la compréhension globale des tumeurs solides. Une approche consiste à distinguer les tumeurs dites froides, des tumeurs chaudes afin de prédire leurs réponses aux immunothérapies ou leurs pronostics. Par exemple, les tumeurs froides sont dites non-infiltrées par les cellules immunitaires et sont généralement résistantes aux immunothérapies ciblant les PCI. Pour témoigner de la complexité, une approche plus récente consiste à nuancer davantage les tumeurs et leurs réponses immunitaires en quatre catégories :

- **Les tumeurs dites chaudes** possèdent une activité immunitaire élevée se caractérisant par une importante infiltration de LT, une expression élevée de PCI, une charge mutationnelle tumorale élevée et une augmentation de la signalisation en IFN γ . Malgré la capacité des LT à s'infiltrer dans les tumeurs chaudes, leurs effets peuvent être restreints par divers mécanismes dont des défauts dans le traitement des antigènes tumoraux.
- **Les tumeurs dites immunosupprimées** présentent une quantité intermédiaire de LT infiltrants. Malgré l'absence de barrières physiques, le MET diminue l'activation et le recrutement de cellules immunitaires. Les cellules tumorales ont fréquemment la capacité de détourner l'action des cellules immunitaires, par exemple, avec le recrutement de Treg ou la libération d'IL-10 (interleukine anti-inflammatoire).
- **Les tumeurs dites exclues** se caractérisent par l'accumulation de cellules immunitaires (essentiellement les LT) en périphérie de la tumeur. Les cellules éprouvent des difficultés à pénétrer efficacement dans la masse tumorale, car les cellules tumorales érigent un stroma en barrière physique. Le MET est alors caractérisé par une immunosuppression, comprenant une hypoxie et un appauvrissement métabolique rendant la survie des cellules immunitaires complexe.
- **Les tumeurs dites froides** sont dépourvues de cellules immunitaires et possèdent un faible taux de mutations tumorales, une expression limitée CMH et une faible expression de PD-L1.

Cette méthode est associée à la notion Immunoscore qui permet de quantifier tous les LT et LT CD8+ de la tumeur afin de définir la prise en charge de certains cancers, dont le cancer du côlon. Même si ces classifications ne sont pas encore utilisées en clinique, elles permettent de témoigner de la complexité des tumeurs solides. Les immunothérapies actuelles cherchent à renforcer la réponse immunitaire antitumorale et ainsi à renforcer la réponse immunitaire contre la tumeur. Ainsi traiter, les tumeurs solides, en particulier les tumeurs froides, par CAR-T cell semblent être une piste prometteuse.(40,41)

2) Les défis à relever pour l'application des CAR-T cell dans les tumeurs solides

Tout d'abord, l'application des CAR-T cell dans les tumeurs solides est en plein essor. L'élément clé qui détermine les différences dans les résultats cliniques des thérapies CAR-T cell, est l'accessibilité à la tumeur. Dans les cancers du sang, les cellules malignes sont facilement accessibles par les CAR-T cell. Tandis que dans les tumeurs solides les CAR-T cell sont confrontées à de multiples défis qui limitent les capacités des CAR-T cell conduisant à des résultats cliniques défavorables. Les différents défis à relever concernant l'application des CAR-T cell dans les tumeurs solides seront discutés ci-dessous. (42)

a. Le choix de l'antigène

Un des premiers défis de l'application des CAR-T cell dans les tumeurs solides est le choix de l'antigène cible. Pour rappel, une fois les CAR-T cell parvenus sur leur site d'action au contact des cellules cibles, les CAR-T cell doivent établir des synapses immunologiques grâce à l'engagement du domaine cible de leurs CAR avec les antigènes à la surface des cellules tumorales. Cette rencontre permet le déclenchement et la mise en place des effets cytotoxiques des CAR-T cell. Ainsi, le traitement par CAR-T cell est efficace uniquement en présence de l'antigène. Toute anomalie de l'antigène entrave la capacité tumoricide des CAR-T cell et peut donc causer les rechutes des patients. Le mécanisme de résistance le plus fréquent est l'expression par les cellules cancéreuses d'antigènes à épissages alternatifs qui ne sont pas reconnus par les CAR-T cell. Ce mécanisme de résistance est responsable de certains cas de rechute dans les hémopathies malignes et dans les tumeurs solides. L'exemple suivant peut-être cité, lors d'un essai clinique sur des patients atteints de glioblastomes, traités à l'aide de CAR-T cell dirigées contre l'EGFRvIII (Récepteur du facteur de croissance épidermique variant III): une résistance au traitement a été signalée malgré l'élimination des cellules tumorales positives pour l'EGFRvIII.(35,43,44)

De plus, les tumeurs solides sont plus susceptibles de présenter des TAA caractérisés par une forte expression sur la tumeur elle-même, mais aussi à des niveaux faibles dans les tissus sains. Il existe, également, une forte diversité des TAA entre les différentes tumeurs (exemple tumeurs primaires et métastatiques) et également chez les patients souffrant du même cancer. Ces différents aspects

expliquent la difficulté de la conception d'un CAR adapté pour cibler les cellules cancéreuses dans le cadre des tumeurs solides. C'est pour cela que trouver l'antigène cible constitue le premier challenge dans la mise en place du traitement par CAR-T cell dans les tumeurs solides. (35)

b. Le chemin jusqu'à la tumeur : la migration des CAR-T cell

Une fois l'antigène cible choisi, les CAR-T cell doivent réussir à atteindre la tumeur en migrant depuis leurs sites d'administration. Cette migration est apparentée à celle des LT et dépend de plusieurs facteurs dont les chimiokines et les vaisseaux sanguins.(45)

Les vaisseaux sanguins

Un obstacle rencontré par les CAR-T cell est la vascularisation associée à la tumeur. Dans un contexte inflammatoire classique, les cellules immunitaires traversent les vaisseaux sanguins à l'aide d'un processus nommé diapédèse (*schématisée sur la figure 12*). Ce processus découle de divers éléments dont l'augmentation des intégrines et des sélectines, ainsi que la reconnaissance de différents couples ligands-récepteurs. Dans les tumeurs solides, l'endothélium vasculaire peut être activé par de nombreuses molécules angiogéniques produites par les cellules tumorales, entraînant une anomalie structurelle des vaisseaux sanguins. Cette anomalie structurelle est caractérisée par : une infiltration anormale de sang, une pression interstitielle amplifiée et un déséquilibre de l'oxygène. Il est de plus en plus clair que l'angiogenèse induite par la tumeur contribue à l'immunosuppression et à l'évasion immunitaire. Notamment dû aux propriétés physiques induites par les vaisseaux altérés et des niches hypoxiques qui impactent l'infiltration des cellules immunitaires. (42,45)

Les cellules endothéliales expriment des ligands vasculaires spécifiques à leurs tissus environnants. Les tumeurs sont capables de modifier la nature et la quantité de ces ligands. Par exemple, sous l'influence du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) : les molécules d'adhésion telles que la E-sélectine et la molécule d'adhésion des cellules vasculaires (VCAM-1) sont diminuées sur les cellules endothéliales induisant une anergie des cellules endothéliales. Cette anergie constitue une barrière contre l'infiltration des cellules immunitaires dans les tumeurs solides. Par exemple, dans les tumeurs pulmonaires, les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins arborant la tumeur présentent une expression réduite de la VCAM-1 tandis que les vaisseaux sains non. Ce qui participe à la diminution de la population en cellules immunitaire au sein de la tumeur. De plus, des études *in vitro*, ont permis une meilleure compréhension des phénotypes immunorégulateurs des différentes sous-populations des cellules immunitaires. Entre autres, les médiateurs pro-angiogéniques peuvent avoir un impact direct sur les cellules immunitaires. Par exemple, le VEGF-A supprime la maturation des CD, augmente les Treg et renforce l'état immunosuppresseur des MDSC. De plus, les PCI dont TIM-3 et PDL-1 peuvent être augmentés au niveau des vaisseaux sanguins tumoraux.(38,44,45)

Les chimiokines

Les cytokines quant à elles exercent des effets chimiotactiques. Ainsi, les chimiokines et leurs récepteurs homologues sont considérés comme un élément essentiel à la migration transendothéliale des cellules immunitaires. Les cellules immunitaires utilisent les chimiokines comme marqueurs directionnels. Les LT naïfs se distinguent des LT matures par l'expression de récepteurs spécifiques tels que les récepteurs CC de la chimiokine 7 (CCR7). Au fur et à mesure de leurs évolutions, les LT sont stimulés et différenciés dans les tissus lymphoïdes. Ce changement permet aux LT matures d'exprimer un profil de récepteurs singuliers afin de pouvoir localiser de manière précise leurs cibles. Par exemple, la perte de CCR7 permet la migration des LT matures vers des tissus non lymphoïdes. Ainsi, chaque tissu cible possède un ensemble de ligands qui interagissent avec les récepteurs correspondants sur les sous-populations de LT.(45)

Dans le cadre du cancer, le MET induit un profil spécifique de cytokines et de chimiokines. Pour prévenir l'infiltration des LT, les tumeurs peuvent altérer leurs profils d'expression en chimiokines de diverses manières. Par exemple, la nitrosylation induite par des espèces azotées réactives peut affecter la chimiokine ligand-2 (CCL2), réduisant ainsi son pouvoir chimioattractif sur les LT effecteurs et sans avoir d'impact sur les MDSC. D'autres mécanismes, tels que la régulation par des voies de signalisation et le remodelage épigénétique peuvent également entrer en jeu. De plus, dans certains cas, une expression anormale de chimiokines est associée à une augmentation de l'angiogenèse, la formation de lésions tumorales métastatiques et la croissance des cellules tumorales. Il existe certaines études qui examinent l'expression génétique des chimiokines et l'infiltration des cellules immunitaires dans les tumeurs. Une d'entre elles a permis de montrer une corrélation positive entre l'expression des chimiokines CXC Ligand-9 (CXCL9) et CXCL10 et l'infiltration des cellules immunitaires. Néanmoins, il est possible que l'augmentation de la migration des LT permette la métastase des cellules cancéreuses. (38,44,45)

Les granulocytes

Il existe certaines cellules qui contribuent négativement à la migration des LT dans le cancer comme les macrophages, les CD immatures, les MDSC et les Treg. Par ailleurs, il existe également des cellules qui participent positivement à la migration des LT notamment les granulocytes (éosinophiles, neutrophiles et basophiles). Les éosinophiles semblent être associés à un bon pronostic pour certaines tumeurs solides. Pour le moment, l'influence des éosinophiles sur l'interaction entre la tumeur et l'hôte est très peu comprise. Cependant, il est apparu que les éosinophiles sont capables d'agir sur la migration des LT dans des modèles de mélanomes murins. Dans cette étude, l'augmentation des éosinophiles accroissait la migration des LT grâce à l'expression de chimiokines (CCL5, CXCL9, CXCL10) et leurs contributions à la normalisation des vaisseaux sanguins.(45)

Au cours de leurs migrations, *comme on peut le voir sur la figure 12*, les CAR-T cell doivent être capables de détecter les chimiokines, de migrer efficacement et d'adhérer à la paroi du vaisseau sanguin, d'initier la migration transendothéliale et finalement d'envahir le stroma de la tumeur. Une fois le site de la tumeur atteint, il existe des éléments qui rendent le MET hostile pour les CAR-T cell.(46)

c. Le microenvironnement tumoral : environnement hostile pour les CAR-T cell

Une fois la migration réussie, il est tout aussi important que les cellules soient capables de survivre, de proliférer et d'agir. Les tumeurs solides ont une structure tridimensionnelle complexe dans laquelle les cellules cancéreuses sont difficilement accessibles. Certaines tumeurs solides organisent leurs cellules cancéreuses en îlots, soutenues par le stroma. Dans certains cas, le MET est qualifié d'hostile (*figure 12*) car il peut conduire à l'épuisement des LT ou composer une barrière physique empêchant l'accès à la tumeur. Les données provenant de modèles de tumeurs solides indiquent que la persistance des cellules CAR-T cell est associée à des niveaux croissants d'hypofonctionnements. Les éléments qui contribuent à rendre le MET hostile sont en grande partie sa MEC et le changement métabolique induit par ces différents composants. (45,47)

La matrice extracellulaire

Une des caractéristiques de la progression tumorale est la rigidité de la MEC suite à l'augmentation de la réticulation de la matrice, au dépôt de collagène et à l'alignement des fibres. Les cellules interagissent directement avec la MEC via des récepteurs tels que les intégrines et le CD44, participant ainsi à divers réseaux de signalisation activés dans le cancer. La MEC perturbe la régulation de la migration, de la prolifération et de l'apoptose des cellules via la mécanotransduction. Dans les cancers du poumon à petites cellules, il a été montré que d'épais réseaux de fibres de collagène I, entourant souvent les îlots tumoraux, empêchaient les LT de migrer et d'atteindre les cellules cancéreuses. Étant donné que la production de protéines de la MEC est assurée par les fibroblastes, l'attention s'est portée sur les fibroblastes et leurs régulations. Dans ce contexte, le TGF β est apparu comme un facteur responsable de l'activation des fibroblastes et de leurs productions excessives de collagène. Du fait de cette contrainte physique, la migration des cellules dans le MET dépend d'enzymes comme les métalloprotéinases matricielles (MMP) pour dégrader et réorganiser le réseau réticulé. Malheureusement, les LT ne sécrètent pas souvent d'enzymes pour dégrader la MEC, mais choisissent plutôt le chemin de moindre résistance ou suivent les directives de contact imposées par les caractéristiques architecturales de la MEC environnante. (44,45,48)

Limitations métaboliques

D'un autre côté, les LT sont des cellules qualifiées de sensibles face aux différents stimuli apportés par leurs environnements dû à leurs métabolismes qui leur permet de réagir rapidement. Dans un premier temps, le métabolisme des LT est influencé par l'apport en oxygène et nutriments présents dans leurs environnements. Dans un MET hostile, la croissance incontrôlée des cellules cancéreuses induit un déséquilibre en métabolites et en oxygène. Par exemple, certaines tumeurs surexpriment l'enzyme indoleamine-2,3-dioxygénase (IDO) lors d'un stade avancé de la maladie. Cette enzyme permet la dégradation du tryptophane par la voie de kynurénine. L'épuisement du tryptophane dans le milieu par l'IDO entraîne une immunosuppression avec la formation de Treg, l'attraction de MDSC voir l'apoptose des LT.(44,45)

De plus, certains cancers présentent un gain de fonction de l'isocitrate déshydrogénase (IDH) qui produit du D-2 hydroxyglutarate (D-2HG), un oncométabolite. Une étude a permis de souligner la capacité de l'oncométabolite 2-DHG à agir dans le microenvironnement tumoral afin d'empêcher la destruction des cellules tumorale par le système immunitaire. Le D-2HG est absorbé par les LT CD8⁺ et inhibe la lactate déshydrogénase (LDH). Cette action perturbe l'équilibre NAD⁺/NADH et augmente les IFN gamma. Finalement, les LT CD8⁺ voient leurs métabolismes du glucose altérer ce qui corrompt leurs propriétés antitumorales. Un autre exemple de l'action du MET hostile (hypoxique en particulier) est l'augmentation de la dégradation de l'adénosine triphosphate (ATP) et la suppression de l'adénosine kinase qui a pour conséquence une augmentation de l'adénosine extracellulaire. Cette adénosine extracellulaire va interagir avec ces récepteurs spécifiques (A2AR et A2BR) et inhiber les réponses immunitaires anti-tumorales. De même, la production excessive de spécimens réactifs de l'oxygène (ROS) perturbe les voies métaboliques. Ainsi, on comprend que les caractéristiques de ce microenvironnement, tel que l'hypoxie, l'acidose et la présence de métabolites immunosuppresseurs peuvent influencer négativement la persistance et l'efficacité des CAR-T cell.(49,50)

Autres déterminants

Outre la MEC qui constitue une barrière physique, d'autres cellules et déterminants ont été identifiés comme empêchant les LT de pénétrer dans les îlots tumoraux. Par exemple, les macrophages peuvent exercer une influence négative sur la migration des LT en formant des interactions avec eux, les séquestrant ainsi dans le stroma. Il semblerait que les chimiokines puissent également contrôler le positionnement des LT dans les tumeurs. Contrairement à leurs fonctions attractives décrites dans le paragraphe précédent (*migration des CAR-T cell*), certaines chimiokines présentent, à des doses élevées, des effets répulsifs. Par exemple, dans les cancers du pancréas, la présence de CXCL12 est associée à l'absence de LT dans les îlots tumoraux par un mécanisme qui repose sur l'association de cette chimiokine avec la kératine-19.(45,49,51)

Une fois activés, les LT prolifèrent et produisent des cytokines, mais régulent également les molécules de surface inhibitrices (exemple PDL-1). Il est établi que lors d'une stimulation antigénique chronique, les lymphocytes infiltrant les tumeurs maintiennent un niveau élevé de PD-1, ce qui participe à leurs épuisements. Cet état de dysfonctionnement cellulaire se caractérise par une perte graduelle et progressive des fonctions effectrices, dont la cytotoxicité et la prolifération. Les LT épuisés expriment de multiples récepteurs inhibiteurs et présentent un état transcriptionnel différent de celui des LT fonctionnels. La découverte des inhibiteurs de PCI permettant de lever le frein de la suppression des LT a révolutionné le traitement du cancer. Bien que la mobilité des LT soit un facteur déterminant le succès des CAR-T cell, on ne dispose que de peu de données expérimentales sur les liens potentiels entre le blocage des PCI et la migration des LT. Certaines études ont relié une forte expression de PD-L1 et un nombre réduit de LT infiltrant la tumeur. Tandis que cet aspect n'a pas pu être mis en évidence dans d'autres études. Cependant, il est tout de même établi que les PCI permettent de témoigner de l'état d'épuisement des LT. (45)

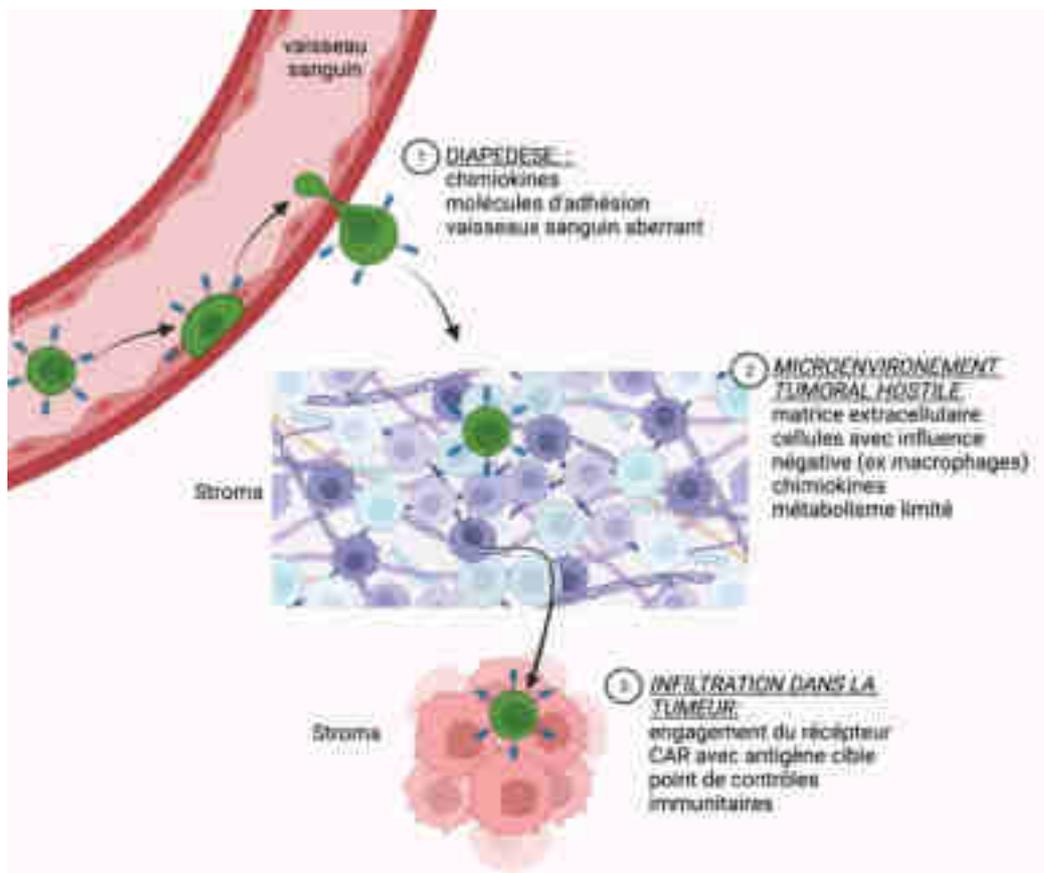


Figure 12 Schéma représentant les différentes étapes de la migration des CAR- T cell jusqu'à la tumeur(45)

(1) Les CAR-T cell sortent par diapédèse des vaisseaux sanguins afin d'arriver sur le site tumoral. (2) Les CAR-T cell migrent à travers le microenvironnement tumoral composé de fibres et des différents types cellulaires, dont les fibroblastes qui sécrètent la matrice extracellulaire. (3) Finalement, les CAR-T cell entrent en contact avec les cellules cancéreuses et peuvent accomplir leurs fonctions. Toutes ces étapes sont contrôlées par différents composants et cellules dont certains sont mentionnés dans les encadrants. (réalisé à partir de Biorender)

Toutefois, les éléments qui impactent la migration des CAR-T cell et la fonctionnalité de celles-ci ne sont pas encore totalement compris. Les éléments cités ci-dessus sont les éléments les plus démontrés dans les tumeurs solides et constituent le point de départ pour l'amélioration de la technologie des CAR-T cell au sein des tumeurs solides.

3) Stratégies utilisées pour l'application des CAR-T cell dans les tumeurs solides

Cette partie se consacre à l'exploration des différentes méthodes adoptées pour contrer les difficultés associées à l'utilisation des CAR-T cell dans le traitement des tumeurs solides. En se basant sur l'amélioration du CAR et aux approches visant à contourner les résistances induites par le MET. L'objectif est d'apporter un éclairage sur la manière dont les CAR-T cell peuvent être adaptées pour cibler efficacement les tumeurs solides, ouvrant ainsi la voie à des traitements efficaces. (49)

a. Optimisation du CAR

Actuellement, des CAR de nouvelles générations sont développés dans le but de régler leurs signalisations, de renforcer la sécurité et la sensibilité aux antigènes, d'améliorer la spécificité et de permettre l'application des CAR-T cell dans les tumeurs solides. Jusqu'à présent, les CAR-T cell décrites ciblent un seul antigène. Ces CAR-T cell monovalentes sont confrontés à l'échappement de l'antigène et à l'hétérogénéité des tumeurs. Une approche pour résoudre ce problème consiste à introduire deux CAR différents dans un même LT, ce qui peut être obtenu à l'aide de CAR bicistroniques, TanCAR ou LoopCAR (Illustrées ci-dessous sur la figure 13).(12)

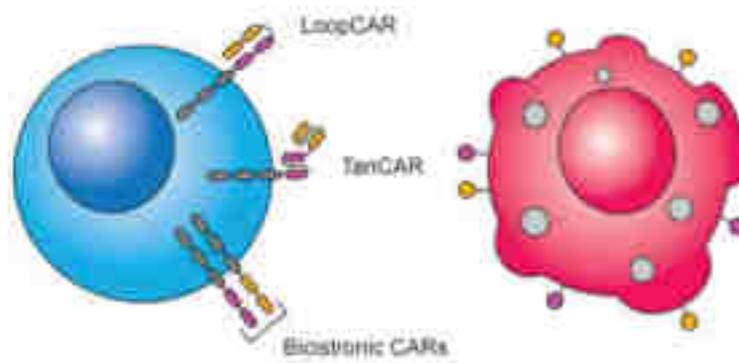


Figure 13 CAR-T cell multi-spécifiques (12)

Il existe au moins trois approches pour concevoir des CAR-T cell multi-spécifiques (cellule bleue) qui reconnaissent plus d'un antigène (jaune et rose sur la figure) sur les cellules cancéreuses (cellule rose). La conception la plus rudimentaire consiste à transduire deux constructions CAR (bicistroniques) ou plus dans une même cellule. Les CAR en tandem (TanCAR) sont des constructions CAR avec plus d'un domaine de liaison scFv joint en tandem, ce qui permet une multi-spécificité sur le même récepteur. Il en est de même pour le LoopCAR qui est construit en tandem avec une structure de boucle.

Les effets indésirables dus à la reconnaissance de l'antigène sur les cellules saines peuvent être augmentés chez les CAR-T cell multi-spécifiques. Ainsi, des stratégies pour diminuer ces risques ont été mis en place notamment en ciblant les modifications post-traductionnelles restreintes à la tumeur, ou bien, en développant des CAR-T cell guidées par la logique booléenne. Cette optimisation récente permet une plus grande spécificité des CAR-T cell. Les termes rationnels tels que « ET » ou « NON » se réfèrent à des restrictions d'activation qui limitent l'activation des cellules, soit à une activation uniquement en présence de deux antigènes cibles, soit à une activation uniquement en présence de l'antigène cible et à une inactivité en présence de l'antigène hors cible. La catégorie « ET » peut être appliquée en séparant les signaux d'activations, de sorte qu'un récepteur contient le signal d'activation primaire (CD3 ζ) et que la seconde construction contienne les domaines de costimulation (CD28/4-1BB). Ces constructions CAR sont des **CAR-T cell à reconnaissances divisées** (*schématisé sur la figure 14*).⁽¹²⁾

La catégorie « NON » peut être obtenue en incluant une signalisation inhibitrice à la place des domaines d'activations pour les antigènes hors cibles. Ainsi, en présence de l'antigène hors cible, les signaux inhibiteurs empêchent l'activation de la cellule. Ces cellules sont connues sous le nom de CAR-T cell inhibitrices (**iCAR-T cell**) (*schématisé sur la figure 14*).⁽¹²⁾

Les catégories « ET » et « NON » peuvent être appliquées dans une seule construction CAR. Par exemple, les **SUPRA CAR** (*figure 15*) permettent de moduler le domaine de liaison à l'antigène et d'affiner l'activation en ajustant leurs liaisons Azip/Bzip et de combiner plusieurs scFv. Certains SUPRA CAR ont été développés pour avoir un domaine inhibiteur séparé, ajoutant la catégorie « NON » à leurs capacités. De plus, d'autres CAR ont été développés dont les **RevCARs** (*composition détaillée dans la figure 14*) qui permettent d'appliquer les fonctions « ET » et « OU » aux CAR-T cell car ils sont capables de cibler une plus grande variété d'antigènes en fonction des modules cibles coadministrés. Des tests précliniques sur plusieurs modèles de souris cancéreuses montrent de puissants effets antitumoraux, ce qui justifie la poursuite des recherches sur les SUPRA CAR et les RevCAR.⁽¹²⁾

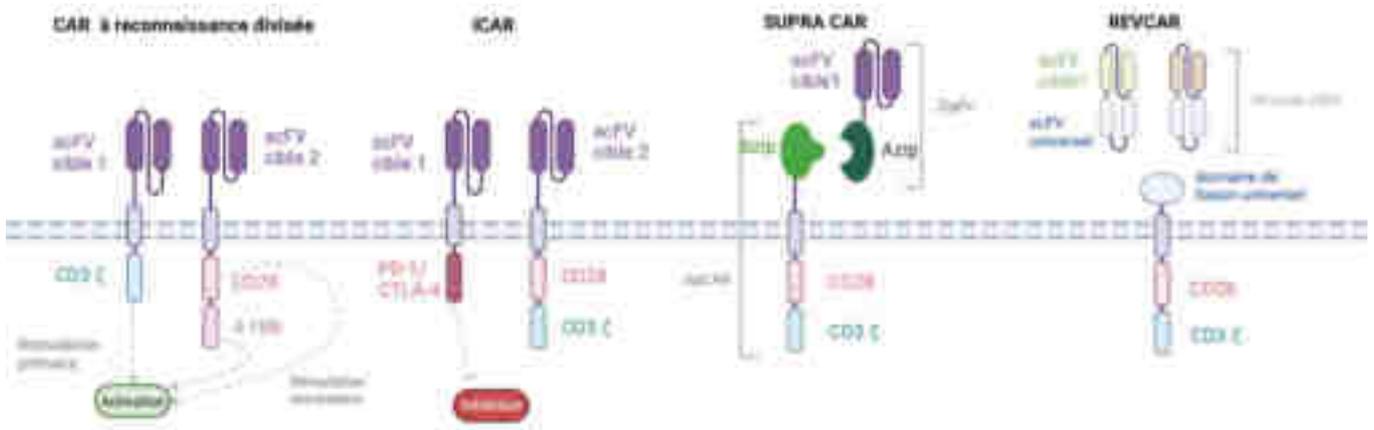


Figure 14 Nouvelles générations de CAR multi spécifiques à logiques booléenne (12)

Les CAR à reconnaissance divisée séparent les domaines d'activation primaires (CD3 ζ) des domaines de costimulation (CD28/4-1BB), chacun ayant des régions de liaison scFv distinctes. L'activation des deux scFvs produit un signal d'activation combiné pour le LT. Les CAR inhibiteurs (iCAR) utilisent un domaine d'activation inhibiteur (PD-1/CTLA-4) afin d'empêcher l'activation du LT lorsque le scFv de l'antigène protégé est lié. Les CAR SUPRA ont une construction plus complexe : un zipCAR (de domaines transmembranaires classiques) et domaines d'activation liés à une glissière de leucine basique (Bzip). Le zipFv (composé d'une région Azip et du scFv) est administré séparément et se lie au Bzip du zipCAR permettant ainsi l'activation du SUPRA CAR. Les RevCAR ont une construction CAR classique dans laquelle le scFv est remplacé par un domaine de liaison universel. Les modules cibles sont administrés séparément et sont composés d'un scFv spécifique du domaine de liaison universel au scFv de liaison spécifique à l'antigène cible. Les TM se lient à la construction CAR et activent le RevCAR. (réalisé à partir de biorender).

D'autres récepteurs ont été développés, dont des récepteurs synthétiques Notch (**SynNotch**) qui fonctionnent en induisant l'expression de protéines effectrices lors de la reconnaissance de l'antigène afin d'appliquer une stratégie "SI-ALORS " (« si » le récepteur SynNotch reconnaît son antigène « alors » l'expression d'un CAR spécifique d'un autre antigène est induite) (*schématisé figure 15*). En 2021, des CAR-T cell SynNotch ont été appliquées dans des modèles *in vivo* de tumeurs solides et se sont montrées efficace pour éliminer les cellules tumorales du glioblastome *in vivo*, tout en localisant l'amorçage des CAR-T cell à l'intérieur des tumeurs. Dans ces études les CAR-T cell SynNotch présentaient un épuisement réduit et une persistance améliorée *in vivo* en comparaison avec les CAR-T cell portant un CAR classique. (12)

Un autre exemple, les **AvidCAR**, se basent sur le fait que dans de nombreuses réactions immunitaires naturelles les interactions avec des antigènes de faibles affinités sont amplifiés par des effets d'avidités. Leurs constructions (*détaillée sur la figure 15*) permettent une dimérisation du CAR avec au moins deux domaines de liaison à l'antigène de faible affinité. Il est possible de contrôler la dimérisation du CAR en ajoutant ou en supprimant une molécule de dimérisation ou en exigeant une double reconnaissance de l'antigène pour que la dimérisation se produise. Les études *in vivo* ont souligné l'efficacité et la spécificité des AvidCAR à commutation "ON" (molécule de dimérisation nécessaire) et des AvidCAR à logique

"AND" (seule la reconnaissance des deux antigènes est nécessaire) tout en ne présentant aucun effet cytotoxique si les conditions requises ne sont pas remplies.(12)

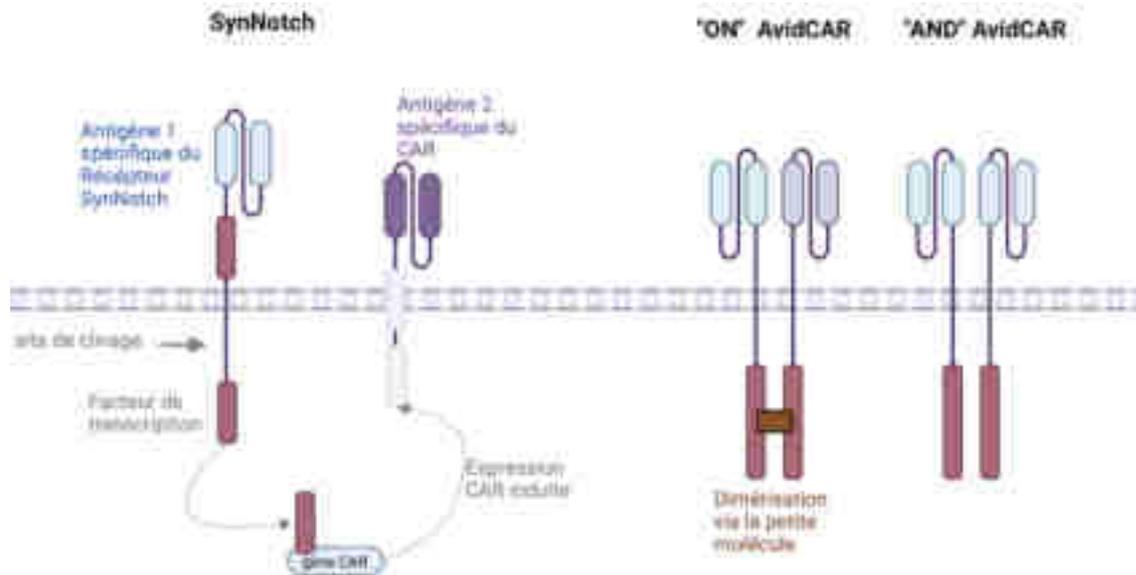


Figure 15 Schéma représentant les CAR de nouvelles générations : CAR SynNotch et AvidCAR (12)

Les CAR SynNotch (récepteurs synthétiques Notch) sont conçus pour limiter l'activation des cellules en exigeant une étape d'amorçage. Lorsque le récepteur SynNotch se lie à son antigène spécifique : le clivage de la protéase libère le domaine activateur transcriptionnel intracellulaire pour induire l'expression d'un deuxième CAR spécifique d'un autre antigène. Les AvidCAR utilisent les effets d'avidité et la dimérisation des domaines de signalisation pour déclencher les fonctions antitumorales des CAR-T cell. Les AvidCAR à catégorie « ON » permettent l'activation des CAR-T cell que lorsque les deux régions de liaison à l'antigène lient leur antigène cible et lorsqu'une molécule de dimérisation est administrée. Les AvidCAR à catégorie « AND » nécessitent que les deux domaines de liaison à l'antigène reconnaissent l'antigène 1 et 2 pour induire l'activation des CAR-T cell.

Une approche récente consiste à créer des CAR-T cell guidées par des probiotiques. Un grand nombre d'études cliniques ont montré que certaines tumeurs hébergent des microbiomes qui leur sont spécifiques. Certaines bactéries colonisent sélectivement les tumeurs et se développent de préférence dans les MET hostiles, hypoxiques et nécrotiques. Afin de tirer parti de ces propriétés, plusieurs groupes ont développé une nouvelle classe thérapeutique des bactéries modifiées comme bioréacteurs intratumoraux qui permettent de traiter des tumeurs pour des patients atteints de tumeurs solides. Récemment, un lien a été établi entre ces découvertes et les CAR-T cell : les CAR-T cell guidées par des probiotiques (**ProCAR**). Les CAR-T cell vont cibler des CAR synthétiques qui sont libérés par les bactéries probiotiques colonisant la tumeur (*illustrés sur la figure 16*). Ce système a montré une activation des CAR-T cell de manière sûre et efficace, dans de multiples modèles de xénogreffes et de souris syngéniques, sur plusieurs tumeurs solides. Ces résultats mettent en évidence le potentiel de la plateforme ProCAR pour surmonter l'obstacle que constitue l'identification de cibles CAR appropriées en fournissant un antigène qui est n'est pas lié à la fois au tissu sain et à la génétique de la tumeur. Afin d'aller plus loin sur le concept de ProCAR, ils ont également mis au point des probiotiques multifonctionnels qui libèrent parallèlement des chimiokines afin d'améliorer le recrutement des CAR-T cell.(38,39)

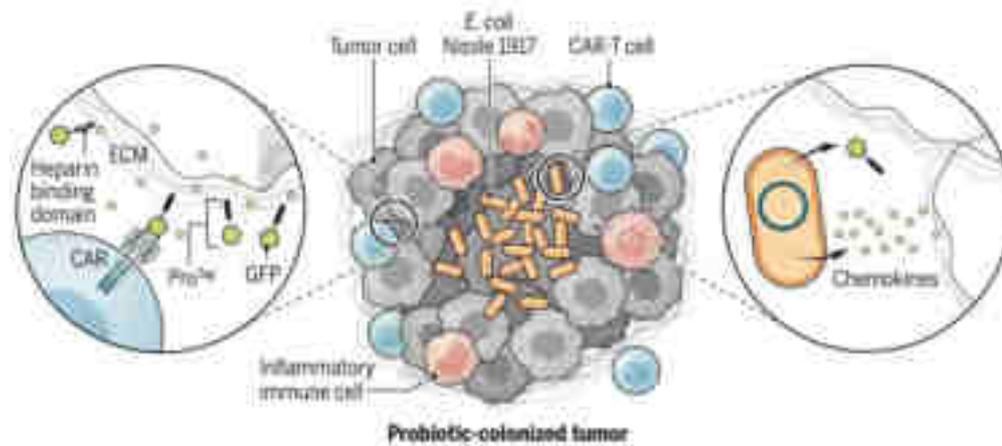


Figure 16 Illustration de CAR-T cell guidée par des probiotiques (ProCAR) (53)

La plateforme ProCAR guidée par des probiotiques utilise *Escherichia coli* Nissle 1917 atténué par ingénierie pour cibler les tumeurs. Ce dernier, modifié pour être moins virulent, libère des protéines appelées ProTag dans le microenvironnement tumoral. Le ProTag possède deux éléments clés : un domaine qui se lie à l'héparine pour lier la matrice extracellulaire et ainsi « marquer » les tumeurs et une protéine verte fluorescente (GFP) que les CAR-T-cell détectent. Les CAR-T cell sont conçues pour reconnaître la GFP, ce qui les dirige vers les tumeurs. De plus, *Escherichia coli* Nissle 1917 peut être programmé pour produire des chimiokines, stimulant ainsi l'entrée des CAR-T cell dans la tumeur.

Ces nouveaux CAR permettent de palier les problèmes liés à la toxicité hors tumeur. Cependant, ils impliquent une ingénierie complexe des LT, dont l'insertion de plusieurs transgènes dans certains cas. D'autres approches visant à construire des CAR universels, dans lesquels, le domaine de reconnaissance de l'antigène est fourni par perfusion intraveineuse séparée, permettent de modifier la spécificité de l'antigène au cours du traitement. Il est toutefois important de souligner que ces techniques n'ont pas encore été évaluées chez l'Homme. Les différents CAR développés dans cette partie ne représentent qu'une partie des CAR apparus ces dernières années.(9)

b. Améliorer la migration des CAR-T cell

Par la suite, l'efficacité des CAR-T cell dans le traitement des tumeurs solides peut être restreint par la migration limitée des cellules vers les sites tumoraux. Cette partie a pour but d'explorer les différentes stratégies visant à améliorer la migration des CAR-T cell au sein des tumeurs.

Agir sur les chimiokines

Pour commencer, le rôle des chimiokines dans la migration des LT n'est pas une nouveauté, ainsi, agir sur leurs signalisations constitue une piste intéressante pour maximiser la migration des CAR-T cell. Les chimiokines permettent de moduler le trafic d'un grand nombre de cellules, dont les cellules immunitaires grâce à leurs caractéristiques chimiotactiques. Certaines études précliniques ont essayé de tirer parti du réseau de signalisation des chimiokines pour stimuler le recrutement des CAR-T cell à l'aide de méthode de génie génétique pour exprimer un récepteur de chimiokines à la surface des CAR-

T cell. Les récepteurs étudiés sont les suivants : CCR2, CCR2b, CCR4, CCR7, CCR8, CXCR1, CXCR2, CXCR4, CXCR6, ou CXCR3. Malheureusement, l'hétérogénéité observée dans les tumeurs souligne la difficulté d'identifier un candidat pour une infiltration précise des CAR-T cell. Pour le moment, le récepteur à la chimiokine CXCR3 a plus particulièrement attiré l'attention pour stimuler le recrutement des cellules immunitaires après blocage de PD-1 ou traitement par chimiothérapie in vivo. Néanmoins, l'utilisation de récepteurs de chimiokines transgéniques pourrait engendrer des difficultés supplémentaires dont le détournement des CAR-T cell de la tumeur en raison de la non-spécificité des chimiokines. Une étude clinique a montré que la part de migration des CAR-T cell avec récepteurs de chimiokines transgéniques dans des tissus non tumoraux est négligeable, mais que d'autres toxicités sont apparues. (49)

Une autre stratégie, consiste à agir sur l'hétérogénéité des chimiokines exprimé chez les patients. Des méthodes d'administration intra-tumorale sont étudiées pour augmenter le taux d'expression de chimiokines locales. Par exemple, des études précliniques sur le cancer du sein, de l'ovaire et du pancréas ont souligné que les radiations (naturelles ou ionisantes) provoquent la libération d'IL-8 par la tumeur et augmentent l'infiltration de CAR-T cell munies d'un récepteur à l'IL-8. De même que la chimiothérapie Docétaxel semble stimuler la production de CXCL1. C'est toujours dans cette même optique que l'administration au niveau de la tumeur d'adénovirus exprimant la chimiokine CCL17 ou de plasmides d'ADN codant pour des chimiokines sont à l'étude. Par exemple, une étude préclinique a renforcé un adénovirus oncolytique (avec une chimiokine appelée CXCL11) afin d'améliorer l'infiltration des CAR-T cell dans le glioblastome. Les résultats indiquent que les CAR-T cell ciblant B7H3 ne parviennent pas seules à inhiber la croissance du GBM, mais lorsqu'elles sont associées à l'administration intra-tumorale de l'adénovirus oncolytique équipé de CXCL11, elles génèrent une réponse antitumorale durable. De plus, un effet antitumoral est observé en favorisant l'infiltration de LT CD8+ et des macrophages polarisés antitumoraux, tout en réduisant les cellules immunitaires suppressives. Tirer parti des avantages de l'administration et de la production locale de chimiokines est une stratégie moins coûteuse et plus réalisable cliniquement selon certaines études.(49,54)

Agir sur la vascularisation

Parallèlement, la capacité d'infiltration des CAR-T cell dépend également de leurs adhésions aux cellules endothéliales des vaisseaux sanguins pour quitter la circulation sanguine et rejoindre le site tumoral. Pour rappel, cette adhésion est médiée par l'E-selectine et son ligand sialyl Lewis-X (sLeX). Dans la littérature des CAR-T cell renforcées en sLeX par génie génétique facilitent le trafic cellulaire vers le site de la tumeur. De même, les interventions ciblant la vascularisation tumorale afin de la remodeler avec du Bevacizumab (anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF) ou de perméabiliser la BHE avec l'administration intra-artérielle de NEO100 (une guanosine monophosphate cyclique)

améliorent l'infiltration des CAR-T cell. Par exemple, une étude préclinique a exploré si la thérapie anti-VEGF peut améliorer l'efficacité des CAR-T cell chez des souris porteuses de glioblastomes. Les chercheurs ont constaté que le traitement avec l'anticorps anti-VEGF murin améliorait l'infiltration des CAR-T cell dans le MET, avec une meilleure réponse au traitement.(49,55)

Agir sur le MET et autres stratégies

Par ailleurs, une approche consiste à se focaliser sur le MET dense en particulier sur la MEC rigide et de fibroblastes associés au cancer. Par exemple, des CAR-T cell blindées avec des agents de dégradation de la MEC, tels que l'héparanase, obtiennent une meilleure pénétration des cellules *in vivo*. En revanche, des CAR-T cell ciblant la protéine d'activation des fibroblastes permettent d'augmenter leurs migrations, mais engendrent d'importantes toxicités lors d'études précliniques. (49)

Une autre méthode consiste à administrer localement les CAR-T cell. Cette méthode permet non seulement d'améliorer leurs biodistributions dans les tumeurs avec de faibles doses, mais aussi d'éviter la cytotoxicité induite par les voies d'administration systémiques. Certaines études sur des modèles murins ont montré que des CAR-T cell anti-ErbB (récepteur à tyrosine kinase de la famille des facteurs de croissance de l'épiderme), administrées par voie intra-péritonéale, entraînent une réduction de la tumeur en fonction de la dose, mais avec des effets secondaires dose dépendante. Tandis que, les CAR-T cell anti-ErbB administrées par voies intra-tumorales permettaient une réduction partielle de la tumeur sans toxicité. De même, il a été établi que l'administration intra-tumorale, intra-crânienne et intra-ventriculaire de CAR-T cell, afin de traiter des tumeurs du SNC, permettait de contourner efficacement la BHE et de favoriser l'activité antitumorale et la régression des tumeurs de manière beaucoup plus efficace et sûre que l'administration intraveineuse. En outre, ces résultats sont retrouvés lors des essais cliniques de phase 1 portant sur les méthodes d'administration intra-pleurale et intra-hépatique pour le traitement des cancers de la plèvre et du foie réciproquement. Les avancées dans l'optimisation de la migration, combinées aux progrès en conception des CAR, élargissent l'arsenal des CAR-T cell pour obtenir de meilleurs résultats. Cependant, le paysage reste complexe et d'autres stratégies s'avèrent essentielles pour maximiser leurs potentiels thérapeutiques, notamment en agissant sur le MET hostile qui limite la persistance des cellules.(49)

c. Contourner le microenvironnement hostile faible en oxygène et nutriments

Si l'amélioration de la migration des CAR-T cell constitue une étape importante, la confrontation à un MET hostile demeure un obstacle important. Les interactions complexes entre les CAR-T cell et le milieu environnant peuvent réduire leurs efficacités. Cette section parcourt certaines stratégies déployées pour surmonter ce microenvironnement, en mettant l'accent sur l'adaptation des CAR-T cell face à des conditions hypoxiques ou face à leurs changements métaboliques.

Agir face aux conditions hypoxiques

Tout d'abord, la prolifération excessive des cellules cancéreuses et la vascularisation aberrante confrontent potentiellement les CAR-T cell à des conditions hypoxiques. Les conditions hypoxiques sont compensées par les cellules par une augmentation de la production d'enzymes glycolytiques, une diminution de la phosphorylation oxydative et une augmentation de l'expression de VEGF. Mécaniquement, les conditions hypoxiques induisent l'activation des protéines du facteur inductible par l'hypoxie (HIF) qui induit toutes ces compensations. C'est pour cela que des stratégies visant à augmenter HIF dans les CAR-T cell ont été développées. De ce fait, l'incorporation du domaine oxygénosensible de HIF-1a dans la construction du CAR (appelé **HIF-CAR**, **HiCAR** et **HypoxiCAR**) a conduit à des CAR maximisés pour faire face aux conditions hypoxiques. Ainsi, par exemple, les HypoxiCAR-T cell ont une expression du CAR dépendante de la concentration en oxygène du milieu (*schéma figure 17*). Cette technique permet une expression du CAR sélective à la tumeur et une efficacité anti-tumorale améliorée. Elle permet, également, de diminuer les effets secondaires en empêchant l'activation des CAR-T cell hors tumeurs. (49,56)

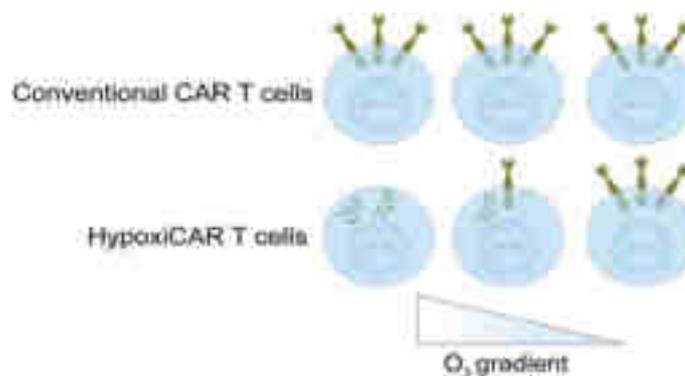


Figure 17 Illustration des HypoxiCAR-T cell (56)

Les HypoxiCAR-T cell sont munis d'un commutateur de détection de l'oxygène permettant une régulation rigoureuse du CAR en fonction de la concentration en oxygène du milieu. De ce fait, les HypoxiCAR voient leurs activations hors de la tumeur réduites par rapport aux CAR-T cell classiques, ce qui limiterait les effets indésirables de la thérapie et offrirait une meilleure efficacité au sein des tumeurs solides.

Agir face aux changements métaboliques

De plus, le MET hostile induit des changements métaboliques suite à la quantité faible de nutriments et d'oxygène dans le milieu. Ces changements peuvent impacter toutes les cellules présentes dans le milieu dont les cellules cancéreuses et les CAR-T cell qui le traversent. Les stratégies visant à perfectionner les CAR-T cell, face aux altérations du métabolisme des tumeurs, ciblent les éléments perturbateurs du MET. Par exemple, l'augmentation d'adénosine dans le milieu suite à la dégradation de l'ATP limite les réponses antitumorales des CAR-T cell. Plusieurs études précliniques, avec des CAR-T cell construites avec un perturbateur d'ancrage de la sous-unité régulatrice I (RIAD) (nommé **RIADCAR**) afin d'inhiber

l'activation des voies de signalisation induite par l'adénosine et son récepteur, ont permis une augmentation de l'activité antitumorale des CAR-T cell dans les tumeurs solides. Une autre étude, mettant en jeu des CAR-T cell coadministrées avec l'agoniste de l'adénosine, a montré les mêmes résultats. Par ailleurs, la production excessive de ROS a incité les chercheurs à équiper les cellules de catalases (nommées **CAR-CAT**) pour améliorer leurs capacités antioxydantes. Ces CAR-CAT présentent *in-vitro* des niveaux de catalases intracellulaires augmentés ainsi qu'un état oxydatif réduit avec une réduction des ROS intracellulaires, tout en maintenant une activité antitumorale.(49,57,58)

De surcroît, étant donné que les cellules tumorales surconsommement les nutriments, il existe une compétition pour les ressources énergétiques entre les cellules tumorales et les CAR-T cell. Cette compétition inspire une autre stratégie qui vise à supprimer le métabolisme tumoral pour une activité optimale des CAR-T cell. Par exemple agir sur les inhibiteurs sélectifs de GLUT-1 (transporteur de glucose de classe 1) tels que la rapamycine, la metformine et un régime cétogène, peut réduire l'absorption du glucose par la tumeur et ainsi permettre une plus grande réponse aux traitements par les CAR-T cell. Dernièrement, la technologie CRISPR/Cas9 a été appliquée pour supprimer des enzymes impliquées dans le métabolisme tumoral, telle que la diacylglycérol kinase. Cette technologie présente des résultats encourageants. Un autre point à noter est qu'il est également possible d'établir une stratégie similaire pour contrecarrer l'acidose due aux lactates. La surproduction de lactates par LDH, notamment la sous-unité LDH-A, favorise la croissance, l'agressivité, et la résistance aux traitements des cellules cancéreuses. Les inhibiteurs de la LDH-A, tels que l'oxamate, un analogue du pyruvate, présentent une efficacité prometteuse. Une étude préclinique indique que l'oxamate améliore l'efficacité de la thérapie CAR-T contre le glioblastome, suggérant son potentiel en tant qu'adjuvant dans le traitement des tumeurs solides. (49,59)

Dans cette partie, plusieurs stratégies ont été détaillées afin de surmonter les défis du MET hostile. Cependant, le MET peut également être qualifié d'hostile via son environnement immunitaire, considéré comme étant immunosuppresseur.

d. Contourner un microenvironnement tumoral immunosuppresseur

Tout d'abord, l'immunosuppression induite par le MET est au centre des recherches en oncologie et le contourner permettrait d'améliorer la prise en charge des cancers. Ce microenvironnement présente des caractéristiques telles que l'infiltration de cellules immunosuppressives, l'expression accrue de molécules inhibitrices, et la production de cytokines immunosuppressives. Pour contourner ces obstacles, plusieurs stratégies sont explorées.(60)

Tout d'abord, une approche consiste à interagir avec les cytokines immunosuppressives et les voies de signalisation inhibitrices en augmentant la libération de cytokines pro-inflammatoires et en redirigeant

les cellules immunitaires suppressives dans le MET. Les efforts de recherche visant à explorer l'utilisation potentielle de cette méthode ont conduit à la création de CAR-T "blindés" ou TRUCKs (*partie I : différentes générations de CAR notamment illustré sur la figure 4*). Ces cellules sont conçues pour surexprimer des cytokines pro-inflammatoires. Par exemple, des études ont démontré que les thérapies utilisant des CAR-T cell exprimant l'IL-18 ont renforcées les réponses antitumorales *in vivo*, stimulant à la fois la prolifération des LT et leurs infiltrations au sein de la tumeur. Une stratégie supplémentaire consiste à rendre les CAR-T cell insensibles aux cytokines immunosuppressives présentes dans MET. Par exemple, les CAR-T cell conçues pour exprimer un récepteur de type défectueux au TGF- β ont démontré une activité antitumorale renforcée. Des essais cliniques évaluant ces CAR-T cell "résistantes au TGF- β " ont été initiés. Dans les résultats d'un essai clinique sorti en 2022 les CAR-T cell résistantes au TGF- β se sont avérées faisables et généralement sûres. De plus, la voie du TGF- β peut être ciblée par des inhibiteurs pharmacologiques et permet un renforcement de l'immunité antitumorale dans des modèles précliniques. (60,61)

Parallèlement, des combinaisons thérapeutiques sont évaluées, intégrant les CAR-T cell avec d'autres agents immunomodulateurs, chimiothérapies ou inhibiteurs métaboliques. Ces approches visent à remodeler le MET et à créer un terrain propice à l'activité antitumorale des cellules. Par exemple, des études précliniques sur plusieurs modèles de tumeurs de CAR-T cell accompagnées par un vaccin ont permis une optimisation des CAR-T cell. Cette co-administration déclenche l'engagement du système immunitaire afin de contourner l'échappement tumoral. Par exemple, on retrouve dans une étude préclinique qui utilise comme vaccin des amphi-ligands constitués d'un ligand pour un CAR sélectionné lié à un ligand amphiphile. Lors de la co-injection avec un adjuvant vaccinal sur le site tumoral, les amphi-ligands se fixent à l'albumine et sont efficacement transportés vers les ganglions lymphatiques. La réponse immunitaire se retrouve renforcée (recrutement CD et LT antitumoral activé en plus grand nombre). La propagation de l'antigène induite par les CAR-T cell, stimulées par le vaccin, a permis d'obtenir une proportion de réponses complètes même lorsque la tumeur initiale était négative à 50 % pour l'antigène CAR. Le renforcement du vaccin constitue une stratégie cliniquement transposable pour obtenir de telles réponses contre les tumeurs solides. D'autre part, des essais cliniques appliquant une chimiothérapie lymphodéplétive avant l'administration de CAR-T cell témoignent également d'une amélioration de la réponse antitumorale des CAR-T cell. Puis, d'autres études précliniques ont montré que la déplétion de MDSC à l'aide de l'immunotoxine Gemtuzumab ozogamicin (anticorps monoclonal anti-CD33) ou du sunitinib (inhibiteur à tyrosine kinase) avait un effet synergique sur l'immunité des CAR-T cell. (49,62)

Enfin, une stratégie consiste à cibler les PCI. Il existe plusieurs stratégies : l'inhibition directe de l'axe à l'aide d'anticorps co-administré, rediriger les CAR-T cell pour qu'elles libèrent des anticorps ciblant l'axe ou bien en supprimant l'expression de PD-1 sur les CAR-T cell. Par exemple des études précliniques sur des CAR-T cell capables de produire des anticorps anti-PD-L1 ont obtenu une immunité antitumorale supérieure. Ou bien, la thérapie combinée avec des anticorps contre l'axe PD-1/PD-L1 a montré des inconvénients tels que l'immunité à court terme, la dépendance aux traitements répétitifs et une toxicité auto-immune importante. Une alternative étudiée en préclinique consiste à utiliser CRISPR/Cas9 pour supprimer l'expression de PD1 afin de permettre aux cellules de persister plus longtemps. En-dehors de l'exploration de l'axe PD-1/PD-L1, diverses recherches ont été entreprises pour examiner d'autres PCI. Dans ce contexte, les CAR-T cell anti-B7H3 font l'objet d'études pour le traitement du glioblastome et obtiennent des résultats encourageants. De même, pour les CAR-T cell qui ciblent CD-47 (point de contrôle des macrophages) dans le traitement des tumeurs pancréatiques ovariennes et de mélanomes CD-47-positives. Plusieurs essais cliniques sont également en cours pour évaluer l'efficacité antitumorale de CAR-T cell produisant des anticorps contre CTLA-4 ou PD-1 dans les tumeurs solides (exemple des **mesoCAR-T cell** NCT03182803). (49,60)

Toutefois, les mécanismes liant immunologie et cancer cherchent encore à être démêlés. Les avancées récentes dans la compréhension du MET immunosuppresseur ont permis le développement de ces stratégies visant à améliorer la thérapie par CAR-T cell. De plus, l'immunosuppression induite par la tumeur induit l'épuisement des CAR-T cell et la contourner permettrait d'améliorer la persistance des CAR-T cell aux seins des tumeurs. (60)

e. Lutter contre l'épuisement des CAR-T cell

L'épuisement des CAR-T cell est attribué à une stimulation antigénique persistante et à un MET immunosuppresseur. L'atténuation de l'épuisement pour maintenir la fonction effectrice et la persistance des CAR-T cell et atteindre l'efficacité clinique reste un défi central. Les parties précédentes développent déjà des stratégies qui permettent d'améliorer la persistante des CAR-T cell. Cette section développe d'autres moyens pour lutter contre l'épuisement des CAR-T cell.(63)

Dans un premier temps, une stratégie consiste à agir sur les domaines de costimulations du CAR, étant donné que dans les essais cliniques sur les CAR-T cell incorporant le domaine de costimulation 4-1BB sont plus persistantes que celles incorporant le CD28. Cependant, certaines études précliniques soulignent que l'incorporation du domaine 4-1BB déclenche un faible signal costimulatoire tout en permettant l'activation des LT avec une plus faible expression des gènes liés à l'épuisement et une survie à long terme des CAR-T cell. En outre, un rapport publié en juin 2023 indique que l'ajout d'un domaine intracellulaire constitutivement actif de c-kit (une voie physiologique associée au caractère souche des

cellules progénitrices hématopoïétiques) aux CAR-T cell, active la signalisation STAT3 et STAT5, entraînant une augmentation de la sécrétion d'IFN γ , de la cytotoxicité et de la persistance des cellules ce qui se traduit par une augmentation de l'activité antitumorale. En parallèle, une approche repose sur la mise en repos temporaires des CAR-T cell afin de rompre la stimulation chronique. Des études précliniques avec des CAR-T cell dites « commutables » obtenues avec l'inhibition pharmacologique temporaire de la signalisation CAR, à l'aide de l'inhibiteur de tyrosine kinase dasatinib ou à l'aide de l'introduction d'un domaine de dégradation inductible. Cette désactivation temporaire offre théoriquement la possibilité aux cellules de se rétablir une fois que le signal de l'interrupteur est supprimé.(47,49,64)

D'un autre côté, une stratégie consiste à utiliser des anticorps monoclonaux agonistes pour stimuler les récepteurs de costimulation des LT. Cette approche vise à maximiser l'activation immunitaire en ciblant des molécules de costimulation importantes de la superfamille des récepteurs TNF (*tumor necrosis factor*) notamment CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), CD40 et CD27. Ces molécules ont montré leurs puissances dans des modèles précliniques, et des essais cliniques de phase 1/2 sont en cours pour évaluer l'efficacité de cette stratégie.(49)

D'autre part, l'évolution des CAR-T cell en sous-ensembles effecteur ou mémoire semble être liée à leurs profils métaboliques. Les CAR-T cell avec un métabolisme glycolytique élevé ont tendance à se différencier en sous-ensemble effecteur avec un faible potentiel invasif et une persistance limitée. Tandis que, les CAR-T cell qui utilisent préférentiellement la phosphorylation oxydative ont une prédisposition à évoluer en sous-ensemble mémoire avec une faible capacité migratoire, mais avec une meilleure persistance. Ainsi, une stratégie consiste à restreindre le métabolisme glycolytique tout au long des procédures de fabrication et à le favoriser au sein de la tumeur. Au cours des procédures de fabrication des CAR-T cell, l'inhibition directe de la glycolyse en interférant avec les voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR à l'aide de l'inhibiteur sélectif de la phosphoinositide-3-kinase (PI3K) ainsi que l'inhibition indirecte de la glycolyse par l'ajout d'IL-15 ou d'IL-21 dans le milieu conduit à une faible différenciation des LT en LT mémoires. Un autre exemple qui agit également sur les procédés de fabrication des CAR-T cell, est la supplémentation en L-arginine des milieux, afin de favoriser la phosphorylation oxydative chez les cellules. Ainsi, la restriction transitoire du glucose dans les milieux de cultures cellulaires pourrait induire des CAR-T cell plus persistantes. (49)

Contourner l'épuisement des CAR-T cell en développant des moyens pour modifier les CAR-T cell pour les rendre plus persistantes et moins susceptibles d'hypofonctionnements est une stratégie qui semble prometteuse. Surtout que deux essais cliniques dont les résultats ont été publiés ces dernières années ont montré des succès encourageants chez des patients atteints de tumeurs solides en utilisant cette approche.(47)

f. Cellules immunitaires alternatives

Récemment, une stratégie consiste à exprimer le CAR dans d'autres cellules que des LT afin de contourner les différents défis concernant les CAR-T cell et les tumeurs solides. Plusieurs cellules de l'immunité innée présentent une activité antitumorale et n'induisent pas de GVHD ce qui laisse entrevoir la possibilité qu'elles puissent constituer une source prête à l'emploi de cellules présentant une toxicité réduite et un meilleur trafic tumoral. Cependant, les cellules immunitaires innées allogéniques restent susceptibles d'être rejetées. En effet, il y a à la fois très peu de données et certains doutes concernant leurs persistances.(12)

Actuellement, les cellules étudiées sont les *Natural Killer* (NK), les NK invariant T (iNKT), les LT $\gamma\delta$ et les macrophages. Par exemple, des CAR NK allogéniques issus du sang de cordon ombilical incorporant l'IL-15 se sont révélés prometteurs dans un essai de phase I chez des patients atteints de cancer du sang (LNH et LLC). Cependant, l'expression du CAR dans les macrophages présente certains challenges supplémentaires, notamment l'adaptation des domaines de signalisation. Mais des effets antitumoraux associés à une phagocytose amplifiée, une modification du MET et le recrutement de LT ont été démontrés dans plusieurs modèles précliniques. Les cellules iNKT-CAR ont exercé une activité antitumorale dans des modèles précliniques, en partie en amorçant les LT CD8 de l'hôte vers les antigènes tumoraux. Ces mêmes cellules ont présenté une sécurité et faisabilité dans un essai de phase I chez des patients atteints de neuroblastome. Ainsi, l'utilisation de cellules immunitaires alternatives semble aussi avoir sa place pour permettre une application des thérapies géniques CAR dans les tumeurs solides. (9,12)

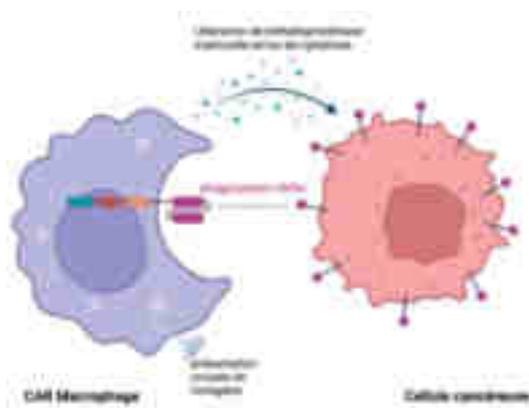


Figure 18 CAR-Macrophage (12)

La conception classique des CAR pour les macrophages comprend une région scFv spécifique de l'antigène (mauve) qui se lie à l'antigène sur les cellules cibles, un domaine charnière, le domaine transmembranaire telles que CD8 et CD147 (orange), un domaine de signalisation cytosolique qui favorise la phagocytose ou la libération de MMP et de cytokines en fonction du domaine utilisé (rouge), et un domaine de recrutement facultatif pour améliorer la signalisation (bleu). Les fonctions antitumorales des macrophages peuvent être dirigées vers les cellules cancéreuses, y compris la phagocytose et la libération de cytokines inflammatoires et de métalloprotéinases matricielle. De plus, les CAR Macrophage peuvent favoriser l'activation des LT cytotoxiques via la présentation croisée d'antigènes associés à la tumeur ou spécifiques de la tumeur. (Réalisé à partir de Biorender).

Toutes ces stratégies constituent des pistes prometteuses dans l'adoption des CAR-T cell dans les tumeurs solides. Un grand nombre de ces stratégies sont d'ores et déjà étudiées chez des patients atteints de tumeurs solides. La partie suivante traitera ainsi des stratégies appliquées en clinique ainsi que les résultats obtenus.

4) Applications : études cliniques portant sur les CAR-T cell dans les tumeurs solides

La convergence des succès antérieurs en matière de thérapie CAR-T cell dans le domaine des hémopathies malignes, où des taux remarquables de rémission prolongée ont été obtenus, avec les récentes percées dans les modèles précliniques, a engendré une multiplication de plus de 250 essais cliniques. Ces essais sont menés à l'international par divers centres médicaux et cherchent à déterminer l'efficacité et la sécurité des CAR-T cell dans le contexte des tumeurs solides. La sous-partie procède à une analyse des essais cliniques ayant documenté leurs résultats et ne concerne pas les thérapies CAR appliquées dans d'autres cellules immunitaires. (65)

a. Les Antigènes cibles

Afin de présenter dans sa globalité l'application des CAR-T cell dans les tumeurs solides en clinique, certains antigènes seront développés. Une part des antigènes actuellement étudiés en clinique ainsi que leurs applications sont visibles sur la *figure 19*. Les antigènes développés ci-dessous sont ceux pour lesquels les résultats des essais cliniques sont accessibles.

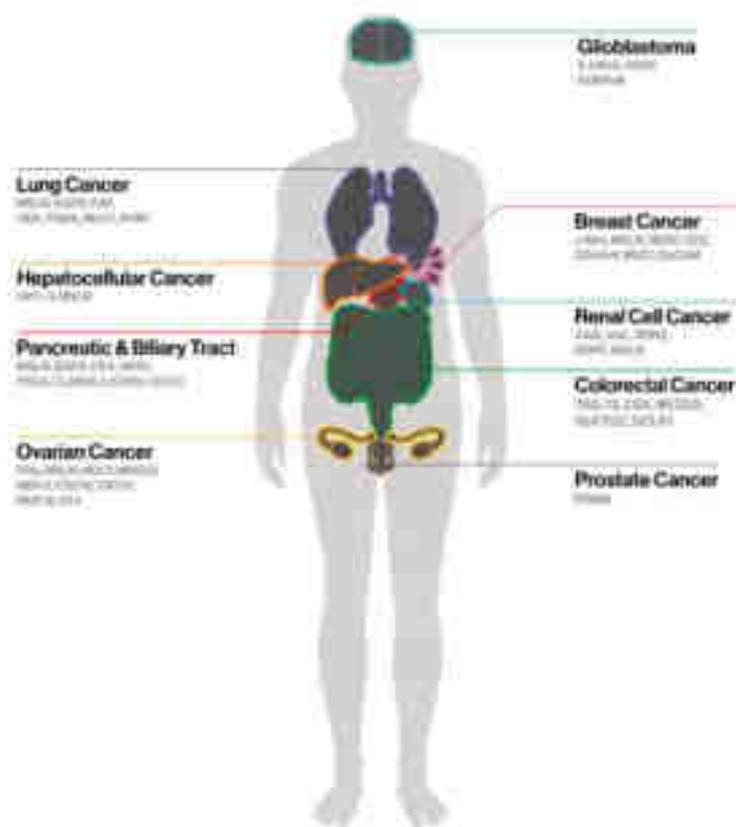


Figure 19 Schéma représentant les antigènes associés aux tumeurs étudiées en clinique pour l'application des CAR-T cell dans les tumeurs solides (65)

CEA : Antigène carcinoembryonnaire, MSLN : Mésothéline, EGFR : Récepteur du facteur de croissance épidermique, HER-2 : Human epidermal growth factor receptor-2, GPC3 : Glypican-3, PSMA : Antigène membranaire spécifique de la prostate, CLDN18.2 : Claudine 18.2, IL13RA2 : Récepteur alpha 2 de l'Interleukine 13, PSCA : Prostate stem cell antigen, TAG-72 : tumor-associated glycoprotein-72, FR- α : Récepteur folate alpha), GD2 : Ganglioside 2, MUC1 : Mucin-1, MUC16 : Mucin-16, NKG2D : Natural killer group 2d, EpCAM : epithelial cell adhesion molecule, FAP : Fibroblast activating protein, CAIX : Carbonique anhydrase IX, c-Met : c-mesenchymal- epithelial transition factor, ROR : Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor, GUCY2C : Guanylyl cyclase 2C, DCLK1 : Doublecortin-like kinase 1, AXL : AXL receptor tyrosine kinase

CEA

Premier antigène cible étudié : l'antigène carcinoembryonnaire (CEA). Il s'agit d'une glycoprotéine ancrée dans le glycosylphosphatidylinositol qui est surexprimée chez plus de 80 % des patients atteints de cancer colorectal. Il est surexprimé à la surface des cellules de nombreuses tumeurs d'origine épithéliale, dont les tumeurs des ovaires, du pancréas, de l'estomac et des poumons. Étant donné son expression élargie à d'autres tissus, il est impératif de surveiller la toxicité hors tumeur. Dans une étude en cours sur le cancer colorectal, les CAR-T cell anti-CEA n'ont montré aucun effet indésirable grave. Néanmoins, les cellules n'ont persisté que 4 à 6 semaines après la perfusion (NCT03682744). Une autre étude sur dix patients atteints de cancer colorectal avec des doses variant de 1×10^5 à 1×10^8 cellules pour évaluer l'innocuité et l'efficacité du traitement (NCT02349724) à montrer que sept patients dont la maladie avait progressé malgré des traitements antérieurs ont maintenu une stabilité après traitement.

Parallèlement, une étude de (phase 1a) sur six patients atteints de cancer hépatique examine l'administration par l'artère hépatique afin de diminuer les risques de toxicité (NCT01373047) et aucun événement indésirable grave n'a été associé aux modes d'administration. De plus, un patient possédait une maladie stable après 23 mois. Regrettablement, quatre patients ont présenté une augmentation des métastases, de la nécrose ou de la fibrose selon les résultats des biopsies. L'essai suivant (phase 1b) souligne que le CRS (ou l'ICANS) n'est pas associé à l'administration via l'artère hépatique avec une survie moyenne de 8 mois (NCT02416466). (42,49)

EGFRvIII

Par ailleurs, le développement du glioblastome est associé à une surproduction d'EGFR et en particulier de sa variante III. L'EGFRvIII est présent dans 25 à 30 % des tumeurs diagnostiquées de glioblastome. En temps normal, la survie, l'invasion et la résistance aux radiations et à la chimiothérapie dérivent de l'expression de l'EGFRvIII dans la cellule. En préclinique les CAR-T cell ciblant l'EGFRvIII ont obtenu des résultats prometteurs et sont désormais appliqués en clinique. Un avantage sur le plan clinique réside dans la possibilité d'identifier, de suivre et d'éliminer les CAR-T cell exprimant l'EGFR modifié en administrant du cetuximab (anticorps monoclonal ciblant l'EGFR). Ceci est réalisable en effectuant des modifications spécifiques sur l'EGFR tout en préservant un site de liaison avec le cetuximab et en supprimant les domaines I et II ainsi que la queue cytoplasmique de cette protéine. Tout d'abord, deux essais cliniques portent sur des patients atteints de glioblastomes. Les CAR-T cell étudiées sont élaborées de deux manières différentes : soit associées uniquement au 4-1BB (NCT02209376), soit combinées avec CD28 (NCT01454596). Malheureusement, aucune réponse satisfaisante n'a été obtenue pour le moment. Une autre étude de phase 1 sur seize patients atteints de cancer du pancréas a obtenu un résultat d'une survie globale médiane à 4,9 mois pour quatorze patients. De plus, des études cliniques sont en cours dans le cancer du poumon non à petite cellule récurrente (CPNPC) R/R (NCT04153799), dans le cancer avancé des voies biliaires (NCT04976218) et le cancer colorectal (NCT03542799). Ces essais portent sur des CAR-T cell de génération plus avancée notamment avec des CAR-T cell ciblant l'EGFR et exprimant le récepteur CXCR5 ou sécrétant de l'IL-12. (42,49,65)

HER 2

À l'évidence, HER2 est reconnu pour sa surexpression dans de nombreux types de cancer, notamment le cancer du sein, le cancer gastrique, le cancer du pancréas, le CPNPC et le glioblastome et est lié au développement tumoral. Diverses études ont convergé pour établir HER2 en tant que marqueur pronostic potentiel ou cible thérapeutique significative dans le contexte des cancers. L'application des CAR-T cell ciblant HER2 a fait rapidement surgir des problèmes de sécurité à la suite du décès d'un patient atteint de cancer colorectal ayant reçu des CAR-T cell de troisième génération. Toutefois, un essai clinique de phase 1 (NCT03500991) évaluant l'efficacité et la sécurité de l'administration locale de CAR-T cell

anti-HER 2 via un cathéter dans le SNC chez des patients atteints de tumeurs du SNC R/R, a mis en avant des réponses immunitaires significatives (augmentation des chimiokines CCL2 et CXCL10) sans effets indésirables. Cependant, la persistance des CAR-T cell observée chez ces patients est restée faible. Un autre essai clinique de phase 1 (NCT01109095) à dose croissante sur dix-sept patients atteints de glioblastome HER 2 positif avec des CAR-T cell bispécifiques du cytomégalo virus, du virus Epstein-Barr et Adénovirus (HER2-CAR VST) a montré une bonne tolérance et aucune toxicité sévère liées au traitement (*résultats cliniques illustrés dans la figure 20*). Pour l'ensemble de la cohorte de l'étude, la survie globale médiane était de 11,1 mois à partir de la première perfusion de cellules et de 24,5 mois à partir du diagnostic. Une évaluation plus poussée est en cours dans une étude de phase 2 b en tant qu'agent unique ou en combinaison avec d'autres approches immunomodulatrices pour permettre une plus grande efficacité afin de traiter le glioblastome. (49,66)

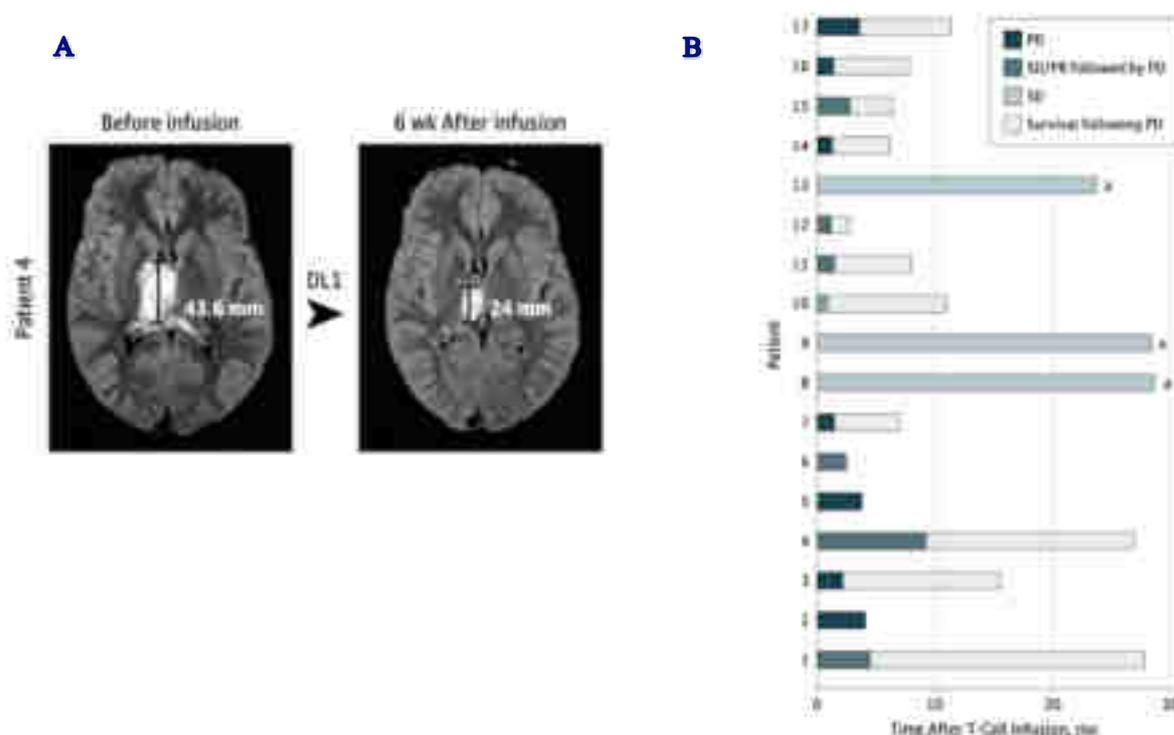


Figure 20 Résultats cliniques après perfusion de CAR-T cell spécifiques du récepteur d'antigène chimérique HER2 (HER2-CAR VST) (66)

Un essai clinique de phase 1 sur 17 patients (8 femmes et 9 hommes ; 10 patients âgés de plus de 18 ans (âge médian 60 ans) et 7 patients âgés de moins de 18 ans (âge médian 14 ans) atteints de glioblastome HER2-positif progressif ont reçu une ou plusieurs perfusions de HER2-CAR VST sans lymphodéplétion préalable (NCT01109095). (A) Une imagerie par résonance magnétique (IRM) du cerveau avant et 6 semaines après la perfusion de HER2-CAR VST. L'IRM de la patiente 4 montre une réponse partielle (RP). (B) Diagramme montrant l'état de la maladie et la survie globale chez les patients traités par HER2-CAR VST. Sur les 16 patients évaluables : 1 patient a eu une réponse partielle pendant plus de 9 mois, 7 ont eu une maladie stable pendant 8 semaines à 29 mois et 8 ont vu leurs maladies progresser après l'infusion de CAR-T cell. 3 patients avec une maladie stable sont en vie sans signe de progression pendant 24 à 29 mois de suivi. (DL) indique le niveau de dose ; (PD) maladie en progression ; (PR) réponse partielle ; et (SD) maladie stable. (a) Vivants.

Mésothéline

Parallèlement, la mésothéline semble aussi jouer un rôle crucial dans divers aspects du développement des tumeurs tels que l'adhésion, la prolifération, la survie et la résistance à la chimiothérapie des cellules tumorales. Elle est fréquemment surexprimée dans les tumeurs notamment dans le cancer du pancréas, de la peau, du poumon, de l'utérus ainsi que dans le cancer du sein triple négatif. En phase préclinique, les CAR-T cell ciblant la mésothéline ont démontré une persistance limitée dans le MET, restreignant ainsi leurs applications parmi les nombreuses tumeurs exprimant la mésothéline. Toutefois, le développement des CAR-T cell anti-mésothéline avec des stratégies pour contourner le MET est en place avec de nombreux essais cliniques de phase I et II. Dans un essai clinique de phase I sur quinze patients atteints de cancer du pancréas, cancer de l'ovaire et cancer de la plèvre traité par CAR-T cell (CD3z/4-1BB), l'anti-mésothéline a mis en avant une bonne tolérance globale (NCT02159716). Onze patients ont vu leur cancer se stabiliser. Mais, comme en préclinique leur persistance est restée faible avec notamment une expansion maximale atteinte entre le 6^{ème} et le 14^{ème} jour et chez les patients ayant été prétraités en cyclophosphamide, une persistance de 28 jours est observée. Compte tenu des effets à court terme obtenu, les CAR-T cell ont été combinées avec des immunothérapies comme les PCI afin d'obtenir une meilleure réponse. Dans une étude clinique de phase I (NCT02414269), sur dix-huit patients atteints du cancer de la plèvre ayant reçu en administration intra-pleural les cellules puis du pembrolizumab (anticorps monoclonal anti-PD-1), huit patients ont vu leur cancer se stabiliser pendant plus de 6 mois. La persistance des CAR-T cell s'est vu optimisée car les cellules étaient détectables dans le sang pendant plus de 100 jours après leurs injections chez 39% des patients. (49)

PSMA

La thérapie CAR-T cell anti-PSMA s'est développée à la suite de recherches menées sur les anticorps monoclonaux et a progressé jusqu'aux essais cliniques. Actuellement, les quatre essais cliniques dont les résultats ont été publiés pour le cancer de la prostate utilisent l'antigène membranaire spécifique de la prostate (PSMA) comme antigène cible. Le PSMA constitue une bonne cible pour les CAR-T cell car il est sécrété par la majorité des cellules du cancer de la prostate ainsi que par les vaisseaux associés à la tumeur. Malheureusement, le PSMA est également exprimé par les tissus non cancéreux et cela engendrerait une toxicité supplémentaire. Pour pallier cela, des CAR-T cell bispécifiques (*iCAR schématisé sur la figure 14*) sont examinées afin de renforcer la spécificité des CAR-T cell. Dans un essai clinique de phase I, des iCAR-T cell anti-PSMA ont été administrées à cinq patients atteints de cancer de la prostate. Les résultats ont révélé une corrélation négative entre la prise de la greffe et les niveaux d'IL-2. C'est pourquoi l'essai clinique de phase II ultérieur a opté pour la combinaison des iCAR-T cellules anti-PSMA avec des doses modérées d'IL-2. L'IL-2 s'est avérée être essentielle pour l'activité

antitumorale des CAR-T cell dans le MET (NCT04053062, NCT04227275, NCT04429451). Bien sûr, des études supplémentaires sont en cours pour mieux comprendre l'efficacité et la sécurité du traitement. En parallèle, un essai clinique de CAR-T cell anti-PSMA qui expriment un récepteur dominant-négatif pour la cytokine immunosuppressive TGF β , a été mené sur treize patients à quatre niveaux de dose. Les résultats ont montré une expansion efficace des CAR-T cell et une réduction supérieure à 98% chez un patient de l'antigène spécifique de la prostate (PSA) et une réduction supérieure à 30% chez trois patients (NCT04249947). Un autre essai clinique en cours explore l'utilisation de CAR-T cell anti-PSMA combiné avec un blocage PD-1 (NCT04768608) dans le traitement du cancer de la prostate métastatique ouvrant ainsi de nouvelles perspectives pour la thérapie cellulaire en tant qu'option de traitement alternative du cancer de la prostate. Récemment, des études cliniques portant sur les CAR-T cell anti-PSMA concernent également le cancer de la vessie (NCT03185468) ou le neuroblastome (NCT04637503). (49,65,67)

Mucin-1

La mucine-1 de la membrane cellulaire (MUC1), produite à la suite de l'expression d'une forme anormale de glycoprotéine, est l'une des protéines qui transporte les protéines O-glycanes (protéines surexprimées dans les adénocarcinomes). Les CAR fondés sur l'anticorps monoclonal 5E5 ciblent l'épitope glycopéptidique de MUC1 convoitant à éliminer les tumeurs pancréatiques (NCT02587689). Récemment, les CAR-T cell anti-MUC1 ont été conçues en intégrant l'ectodomaine du récepteur de l'IL4 ce qui leur confère une plus grande résistance aux cytokines immunosuppressives présentes dans le MET. Une étude clinique de phase I chez un patient souffrant d'un cancer métastatique des vésicules séminales a montré des réponses cytokiniques sans effet indésirable. Ces mêmes CAR-T cell anti-MUC1 ont été optimisées afin d'être déficientes en PD-1 et sont appliquées dans le CPNPC (NCT03525782). Elles se sont avérées bien tolérées. Par ailleurs, dans une autre étude clinique de phase I de CAR-T cell anti MUC1 avec un domaine costimulateur CD2 chez six patients atteints de tumeurs solides surexprimant MUC1 dans le cancer de l'ovaire, du pancréas, du sein et CPNPC, le traitement s'est avéré sans effets toxiques, mais l'évaluation de l'efficacité du traitement est prévue lors de la deuxième phase impliquant soixante-douze patients supplémentaires (NCT04025216).(49)

GD2

Le ganglioside GD2 est un antigène de surface glucidique associé aux tumeurs qui contrairement à d'autres gangliosides exprimé par la plupart des tissus sains est préférentiellement exprimé dans les neuroblastomes, mélanomes, rétinoblastomes et sarcome d'Ewing. Le GD2 possède également des activités immunosuppressives en diminuant l'activation des CD et l'activation des LT. Pour la première fois, des CAR-T cell spécifiques du virus d'Epstein-Barr ciblant le GD2 ont été administrées à huit patients atteints de neuroblastome. Dans cette étude, une régression de la tumeur sans effet indésirable a été observée chez la moitié des patients à court terme. Sur le long terme, les CAR-T cell ont persistées

au moins 4 ans après administration (NCT00085930). Par ailleurs, des CAR-T cell nouvelle génération ont fait l'objet d'un essai clinique de phase I portant sur dix patients pédiatriques atteints de neuroblastome R/R. Les patients ayant reçu le traitement ont affiché très peu d'effets indésirables et une médiane de survie globale de 25 mois (NCT02765243) (*détaillée dans la figure 21*). De plus, le GD2 est une cible qui commence à être bien étudiée dans les tumeurs solides pédiatriques, notamment grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-GD2 dans le neuroblastome et l'ostéosarcome. En tant que telle, la réactivité des tissus sains et la toxicité contre l'anti-GD2 commencent à être bien décrites. Plusieurs études sur les CAR-T cell anti-GD2 sont terminées ou en cours dans les tumeurs solides pédiatriques (NCT02107963, NCT03373097) ce qui rend la thérapie par CAR-T cell anti-GD2 adaptée à une transposition rapide pour les patients atteints de gliomes diffus (*figure 22*). Par exemple, les premiers résultats de l'essai clinique (NCT04196413) chez des patients atteints de gliomes infiltrant du tronc cérébral indiquent qu'aucune toxicité hors-tumorale n'a été observée et que trois des quatre patients ont présenté une amélioration clinique. En parallèle, une étude sur huit patients atteints d'ostéosarcomes et de neuroblastome semble prédire une corrélation négative entre les CAR-T cell anti-GD2 et la présence de MDSC dans le sang périphérique. Cibler les MDSC en thérapies combinées pourrait permettre une meilleure prise en charge des patients.(42,49,68–70)

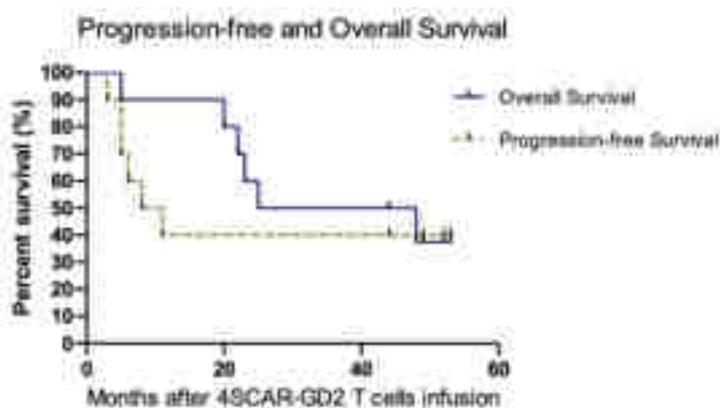


Figure 21 Suivi au long terme des patients ayant reçu des CAR-T cell anti-GD2 (68)

Une étude clinique de phase I utilisant des CAR-T cell anti GD2 de nouvelle génération avec des domaines de signalisation CD28/4-1BB/CD3z-iCasp9 pour le traitement de neuroblastome chez des patients pédiatriques avec une maladie en progression a été menée sur 10 patients (NCT02765243). Après le traitement par CAR-T cell anti GD2, 6 étaient stables à 6 mois et 4 sont restés avec une maladie stable à 1 an et en vie après 3 à 4 ans de suivi. 6 patients sont décédés en raison de la progression de la maladie. La durée médiane de la survie globale était de 25 mois et la durée médiane de la survie sans progression était de 8 mois.

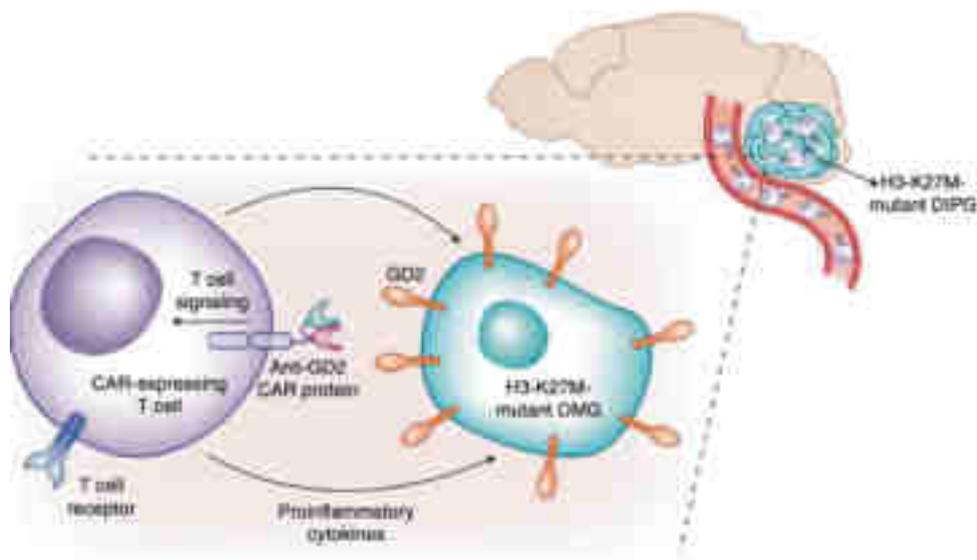


Figure 22 Ciblage des gliomes diffus de la ligne médiane mutants H3-K27M par thérapie CAR-T cell anti-GD2 (70,71)

Les gliomes diffus de la ligne médiane pédiatrique (DMG sur la figure) (dont les gliomes infiltrant du tronc cérébral DIPG sur la figure) sont des tumeurs du système nerveux central qui ne peuvent faire l'objet d'une ablation chirurgicale complète en raison des structures qu'ils infiltrent. Les traitements actuels se limitent à une radiothérapie palliative et la survie médiane après le diagnostic est d'environ 1 an. Des études de séquençage de nouvelle génération réalisées au cours des dernières années ont mis en évidence les fondements génétiques de ces tumeurs. Notamment, une substitution de lysine en méthionine sur le résidu 27 (K27M) des queues N-terminales des variantes d'histone H3.1 et H3.3 est présente dans la quasi-totalité des cas. Il a été précédemment montré que le disialoganglioside GD2 est fortement exprimé sur les cellules de gliome mutées H3K27M et démontre une efficacité préclinique prometteuse des CAR-T cell anti-GD2, ce qui a justifié un premier essai clinique de phase I chez l'homme (NCT04196413). L'interaction entre le GD2 exprimé à la surface des cellules de gliome mutant H3-K27M et la CAR-T cell anti-GD2 entraîne la signalisation du LT et la libération de granzyme et de perforine, ce qui entraîne l'apoptose des cellules exprimant le GD2.

IL13Ra2

Toujours dans le contexte des tumeurs du SNC, les patients présentant un faible taux de survie sur-expriment le récepteur alpha 2 de l'interleukine 13 (IL13Ra2). Il a été découvert que le CAR ciblant l'IL13Ra2 peut détecter à la fois l'IL13Ra2 et l'IL13Ra1. Avec cette découverte, le fragment ScFv spécifique de l'IL13Ra1 est utilisé comme domaine de liaison afin d'améliorer la spécificité. De plus, il a été dévoilé en imagerie que les CAR-T cell ciblant l'IL13Ra2 pénètrent efficacement dans le tissu cérébral et en particulier dans les zones tumorales. La majorité des essais cliniques adoptent une approche intracavitaire ou intracrânienne pour l'administration des CAR-T cell anti IL13Ra2 utilisant un dispositif avec cathéter. Les CAR-T cell sont des CAR-T cell de deuxième génération co-stimulées à l'aide de 4-1BB. Un essai clinique de phase 1 (NCT04510051) pour les patients pédiatriques atteints de tumeurs cérébrales positives à l'IL-13R α 2 est en cours de recrutement et les données cliniques n'ont pas encore été publiées. Pour le moment, les perspectives sont pleines d'espoir pour le traitement des glioblastome (étude de phase 1 sur trois patients NCT00730613). Cependant, dans une deuxième étude,

les données préliminaires sur un patient montrent une régression tumorale, mais malheureusement, elle n'est persistante que 7,5 mois (NCT02208362). Un deuxième essai clinique de phase 1 (NCT04003649) utilisant CAR-T cell ciblant l'IL13Ra2 en combinaison avec les thérapies par anticorps monoclonaux Nivolumab (PD1) et Ipilimumab (CTLA-4) est actuellement en cours. Néanmoins, la faible expression des PCI pourrait constituer un facteur limitant dans le traitement du gliome diffus de la ligne médiane. (49,65,72)

CLDN18.2

La claudine 18.2 (CLDN18.2) est l'isoforme gastrique de CLDN18, une protéine de la jonction serrée. Elle est largement exprimée dans une variété de tumeurs, en particulier celles du système digestif, ce qui en fait une cible thérapeutique anti-tumorale. Les CAR-T cell anti-CLDN18.2 ont démontré une persistance et une infiltration efficace des tissus tumoraux *in vivo* ce qui a permis de présenter les CAR-T cell anti-CLDN18.2 comme cible thérapeutique prometteuse en clinique. Lors d'essais cliniques de phase 1 chez des patients atteints de cancer gastrique, les CAR-T cell anti-CLDN18.2 ont présenté un bon profil de sécurité et une activité anticancéreuse prometteuse. Les données provisoires d'un essai clinique de phase 1 en cours portant sur des CAR-T cell anti-CLDN18.2 (nommées **CT041**) chez des patients ayant préalablement reçu un traitement pour des tumeurs du système digestif CLDN18.2 indiquent que le traitement présente une efficacité prometteuse tout en maintenant un profil de sécurité acceptable. Les trente-sept patients ont été traités avec l'une des trois doses : $2,5 \times 10^8$, $3,75 \times 10^8$ ou $5,0 \times 10^8$ cellules. Aucun cas de CRS de grade 3 ou plus, ni de neurotoxicité n'a été signalés (NCT03159819, NCT03874897). Dans le cadre de ces essais cliniques, on a constaté un taux de survie de 81,2% à 6 mois. D'autres études cliniques sont en cours chez les patients atteints du cancer gastrique, cancer du pancréas (NCT05583201, NCT05472857, NCT04404595, NCT04581473). (49,73)

NKG2D

D'autre part, le récepteur *Natural Killer Group 2D* (NKG2D) joue un rôle central dans la modulation de l'activité des cellules immunitaires effectrices. Il facilite l'activation des voies cytotoxiques dirigées contre les cellules exprimant ces ligands indépendamment du CMH dans des situations de stress. Cette propriété en fait une cible pour les CAR-T cell car NKG2D joue un rôle dans l'immunité innée et adaptative contre les cellules stressées (infectées ou malignes). De plus, NKG2D est surexprimé sur les cellules tumorales, en particulier dans le cancer colorectal. Un essai clinique de phase I dans le cancer colorectal avec des CAR-T cell anti-NKG2D (nommée **CYAD-101**) a permis de souligner une réponse partielle sur deux patients sur quinze. De plus, neuf patients ont maintenu une maladie stable après avoir reçu le traitement en complément de leur traitement à base d'oxaliplatine (NCT03692429). (49)

GPC3

Par ailleurs, le Glypican-3 (GPC3) représente une cible prometteuse, car son expression est spécifique au cancer hépatique. GPC3 fait partie de la famille des protéoglycanes glypican qui sont exprimés à la surface cellulaire via une ancre glycosylphosphatidylinositol. Le GPC3 influe sur la différenciation, la prolifération et la migration cellulaire. Ainsi, une étude de phase I chez treize patients révèle une faible toxicité (hormis un cas d'effet indésirable grave) et un fort potentiel anticancéreux (NCT02395250). En parallèle, un autre essai clinique chez un patient atteint de cancer hépatique ayant reçu des CAR-T cell anti-GPC3 de nouvelles générations (exprimant IL-7 et CCL19) a permis d'éliminer la tumeur du patient (NCT03198546). (49)

B7-H3

Dernier exemple d'antigène cible étudié en clinique pour l'application des CAR-T cell dans les tumeurs solides : B7-H3 (CD276). B7-H3 est une molécule de PCI connu pour être associée à un mauvais pronostic en renforçant l'évasion immunitaire des tumeurs et leur potentiel métastatique. Lors d'études précliniques de CAR-T cell anti-B7-H3 sur des modèles de neuroblastome, de cancer de l'ovaire, du pancréas, les cellules ont montré des effets antitumoraux robustes. Le premier essai clinique de phase 1 BrainChild-03 (NCT04185038) a eu lieu chez cinq patients atteint gliome infiltrant le tronc cérébral avec des CAR-T cell anti-B7-H3 délivrées par voie intracrânienne à doses répétées. Les résultats des trois premiers patients évaluable atteints de gliome infiltrant le tronc cérébral (dont deux ont été recrutés après la progression de la maladie) n'ont pas observé de toxicité limitant la dose et un patient a présenté une amélioration clinique et radiographique pendant les 12 mois de l'étude. Actuellement, plusieurs essais cliniques recrutent des participants, la majorité d'entre eux se concentrant sur les tumeurs malignes R/R du SNC (NCT04077866). (42,49,72,74)

Divers TAA destinés aux CAR-T cell font l'objet de tests dans des essais cliniques. Cela englobe non seulement les exemples précédemment évoqués, mais également d'autres tels que TAG-72 (*tumor-associated glycoprotein-72*), FAP (*fibroblast activating protein*), c-Met (*c-mesenchymal-epithelial transition factor*), FR- α (*folate receptor alpha*), EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*), GUCY2C (*guanylyl cyclase 2C*), etc. En sus, des centaines de cibles potentielles pour la thérapie CAR-T cell sont actuellement évaluées dans le cadre d'essais précliniques appliqués aux tumeurs solides. (42)

b. Persistance des CAR-T cell obtenues en clinique

En ce qui concerne la persistance des CAR-T cell dans les essais cliniques chez des patients atteints de tumeurs solides, les données obtenues sont principalement mesurées à l'aide de détection des CAR-T cell dans les échantillons sanguins, en utilisant des techniques comme la PCR quantitative et/ou la

cytométrie de flux. Dans la plupart des essais, le nombre de transcriptions de l'ADN de CAR-T cell dans le sang se situe généralement entre 10^3 et 10^4 copies par microgramme d'ADN. De plus, la détection des cellules dans le sang est limitée à environ un mois après la perfusion avec un pic observé habituellement entre le 10^e et le 14^e jour. À l'inverse, les essais couronnés de succès impliquant des CAR-T cell anti-CD19 chez des patients atteints de leucémie révèlent fréquemment une concentration élevée de ces cellules dans le sang, généralement de l'ordre de 10^5 à 10^6 copies par microgramme d'ADN, avec une persistance notée sur plusieurs mois à plusieurs années. Une exception dans ces résultats sont les données obtenues lors d'un essai clinique sur des patients pédiatriques atteints de neuroblastome pour lesquelles des niveaux élevés de CAR-T cell ciblant GD2 ont été détectés dans la circulation sanguine, avec des valeurs moyennes maximales atteignant environ 2×10^9 copies par microgramme d'ADN et une persistance pouvant s'étendre jusqu'à 2 ans. Des données limitées laissent également entrevoir que l'utilisation de la lymphodéplétion pourrait légèrement accroître les niveaux de CAR-T cell circulantes chez les patients atteints de tumeurs solides. (47)

Contrairement à l'analyse des échantillons sanguins, peu d'études ont cherché à mesurer la persistance des CAR-T cell dans les tumeurs. Les données disponibles proviennent principalement d'échantillons de biopsies de tumeurs. De plus, dans l'analyse des résultats, il est nécessaire de faire attention à la variabilité dans la méthode et au stade de la tumeur lors des biopsies. Par exemple, des échantillons de biopsie ont été prélevés après l'administration intraveineuse de différentes CAR-T cell (*illustré figure 23*). Malgré les limitations de ces données et les variations entre les différentes études, les résultats convergent et révèlent que les CAR-T cell intra-tumorales sont rarement identifiées de manière systématique avec souvent une persistance limitée. Le pic du nombre de CAR-T cell se situe généralement aux stades précoces (7-14 jours) après l'administration intraveineuse. Par rapport à l'essai clinique chez les patients atteints de leucémie, un nombre relativement faible de CAR-T cell intra-tumorales a été identifié avec une persistance limitée. (47)

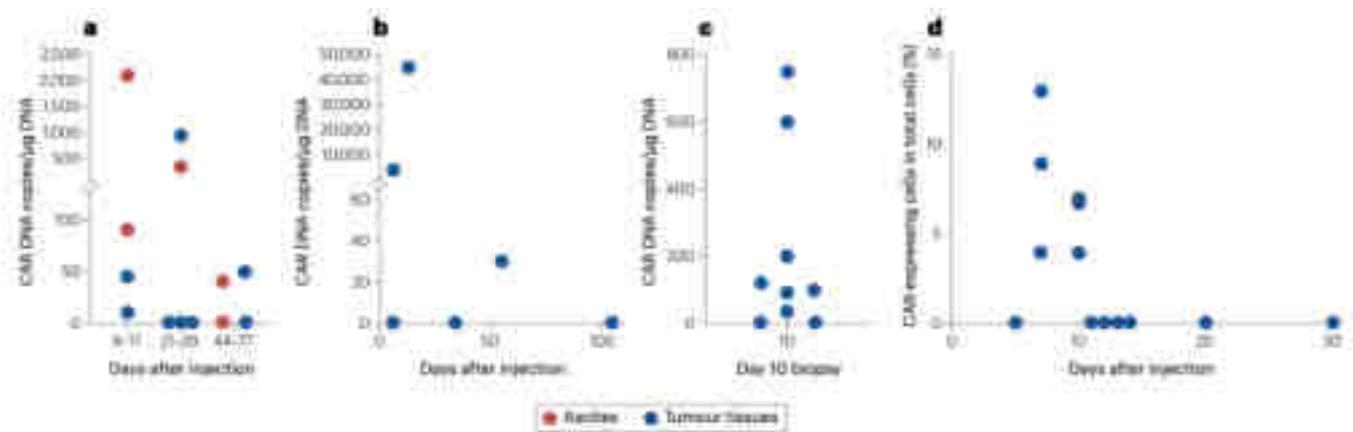


Figure 23 Persistance des CAR-T cell étudiées en clinique dans les tumeurs solides (47)

Les représentations graphiques indiquent la présence de CAR-T cell dans des tumeurs solides et sont reconstituées à partir de données provenant de quatre essais cliniques dans lesquels des échantillons de biopsie ont été obtenus chez certains patients après l'administration intraveineuse de CAR-T cell (a) ciblant la mésothéline pour des patients atteints de CPNPC, de cancer du pancréas ou de l'ovaire ; (b) ciblant l'EGFRvIII pour des patients atteints de glioblastome, (c) ciblant la PSMA avec un allèle TGFBR2 dominant-négatif pour des patients atteints de cancer de la prostate ou (d) ciblant le CD19 pour des patients atteints de lymphome. Dans les trois premiers essais, la détection des CAR-T cell a été réalisée par PCR quantitative afin de calculer le nombre de copies par microgramme d'ADN. Pour l'essai évaluant les CAR-T cell anti-CD19, l'hybridation in situ a été employée pour évaluer le nombre de CAR-T cell présentes dans les échantillons de biopsie.

c. Premières victoires dans l'application des CAR-T cell dans les tumeurs solides

Deux rapports publiés ces dernières années attirent l'attention. Ils ont décrit des niveaux d'efficacité similaires à ceux observés dans certains essais ciblant le CD19 chez des patients atteints de lymphome. Dans un essai de phase I (NCT03874897), trente-sept patients atteints de tumeurs gastriques prétraitées ont reçu des CAR-T cell de deuxième génération spécifique de la CLDN18.2 et ont obtenu un taux de réponse globale de 48,6 % et un taux de contrôle de la maladie de 73,0 %, avec 44,8 % de réponses d'une durée supérieure à 6 mois. Ces résultats sont impressionnants étant donné que ces patients ont été lourdement prétraités et que les thérapies de troisième ligne précédemment rapportées étaient associées à des taux de réponse de 1,7–13 % avec des durées médianes de survie sans progression de 1,6 à 2,6 mois. Dans la seconde étude (NCT03373097), vingt-sept enfants atteints de neuroblastome ont reçu des CAR-T cell de troisième génération ciblant le GD2 avec un taux de réponse complète de 33 % et des réponses partielles chez 30 % d'entre eux (taux de réponse objective de 63 %). Parmi les patients ayant reçu la dose la plus élevée de CAR-T cell une survie globale à trois ans de 60 % et une survie sans effet indésirable de 36 % ont été observées. (73,75)

Ces essais présentent certaines différences compliquant ainsi l'établissement de conclusions définitives. Toutefois, des similitudes sont présentes telles que l'utilisation de doses élevées de CAR-T cell avec des perfusions multiples. De plus, les tumeurs expriment des niveaux modérés à élevés de l'antigène cible sur la majorité des cellules tumorales. Par ailleurs, des niveaux élevés de CAR-T cell circulantes et de

CAR ont été détectés pendant des périodes prolongées par rapport aux autres essais portant sur des patients atteints de tumeurs solides (2 mois contre 2 semaines). Les résultats suggèrent une amélioration de la réponse chez les patients ayant une persistance longue des CAR-T cell. Cependant, cette persistance est inférieure à celle observée dans les essais cliniques antérieurs. Bien que le succès des CAR-T cell de nouvelle génération soit intrigant, les conclusions des données sur la valeur des constructions CAR incorporant de multiples domaines cytoplasmiques co-stimulants sont mitigées. Ces données étayent l'idée que les stratégies citées ci-dessus pourraient réussir chez les patients atteints de tumeurs solides à condition que des niveaux élevés de CAR-T cell fonctionnellement persistantes puissent être générés.

(47)

IV. Conclusion

La technologie des CAR-T cell émerge comme une avancée prometteuse en oncologie que ce soit dans le traitement des hémopathies malignes ou dans les tumeurs solides. Les principes fondamentaux de cette approche reposent sur la modification génétique des LT pour les doter de récepteurs CAR, leur conférant une spécificité envers les cellules tumorales. Le processus de production complexe, allant de l'isolation des LT à leurs réinfusions après modification génétique, constitue une étape cruciale dans leur mise en place. Les indications actuelles des CAR-T cell ciblent les hémopathies malignes et possèdent des résultats cliniques significatifs.

La mise en œuvre des CAR-T cell dans le traitement des tumeurs solides est moins évidente que dans les hémopathies malignes car des défis supplémentaires s'y rajoutent. L'une des difficultés majeures réside dans la diversité des cellules tumorales au sein d'une même tumeur, tant sur le plan génétique que phénotypique. Les CAR-T cell, initialement conçues pour cibler spécifiquement des antigènes tumoraux, peuvent rencontrer des obstacles lorsque des sous-populations de cellules tumorales présentent des profils antigéniques différents. Le deuxième enjeu majeur est la migration des CAR-T cell. Au cours de celle-ci, les CAR-T cell doivent être capables de détecter les chimiokines sur le site de la tumeur, de migrer efficacement et d'adhérer à la paroi du vaisseau sanguin et finalement d'envahir le stroma de la tumeur. Une fois arrivées sur le site de la tumeur, les cellules doivent alors surmonter diverses barrières biochimiques et physiques avant de rencontrer des cellules pro-tumorales qui suppriment l'activité des CAR-T cell. Certaines CAR-T cell peuvent finalement entrer en contact avec la tumeur et avec les cellules cancéreuses cibles qui expriment des PCI abondants, ce qui réduit d'avantage leurs fonctions anti-tumorales.

Le grand nombre d'obstacles au succès thérapeutique nécessitera probablement le ciblage conjoint de plusieurs mécanismes d'évasion. Ces stratégies comprennent l'optimisation par l'ingénierie du CAR, l'optimisation des conditions pendant l'expansion *ex vivo* des LT pour promouvoir l'émergence de sous-types spécifiques de LT. Ces stratégies peuvent aussi impacter directement l'hôte comme par exemple la modification de la MET et/ou la stimulation des LT déjà présents. Les CAR-T cell et leur optimisation ne connaissent pratiquement aucune limite, c'est pourquoi toutes les stratégies n'ont pas été citées. Il est peut-être nécessaire d'utiliser toutes ces approches pour obtenir des résultats optimaux. Il est important de garder en tête que parmi ces nombreux essais précliniques, certains ont perçu des résultats très prometteurs et ont été transposés en essai clinique.

Ainsi, depuis leurs débuts, un certain nombre d'antigènes tumoraux ont été testés comme cibles potentielles pour les CAR-T cell. Les résultats préliminaires d'un essai clinique indiquent que les CAR-T cell ciblant GD2 peuvent générer des réponses durables chez certains patients atteints de

neuroblastomes. Un autre essai clinique montre des signes prometteurs avec des CAR-T cell anti-CLDN18.2 chez les patients atteints de cancer gastrique. À mesure que de nouvelles données cliniques prometteuses seront rapportées, incluant des informations sur le trafic et la fonction des CAR-T cell, les "règles du succès" des CAR-T cell deviendront plus claires.

Cependant, le développement de CAR-T cell ayant un réel impact clinique chez les patients atteints de cancer reste difficile à atteindre pour des raisons qui demeurent encore inconnues. C'est pourquoi il est essentiel de reconnaître les forces et les faiblesses des modèles précliniques actuels et de les appliquer de manière judicieuse. Les études testant les CAR-T cell dérivées de l'homme sur des souris immunodéficientes sont majoritaires dans la littérature. Tandis que les modèles utilisant des CAR-T cell dérivées de la souris sur des souris au système immunitaire intact pourraient être plus prédictifs de ce que nous observons dans les essais cliniques, les progrès des modèles précliniques pourraient être utiles et réduire les écarts obtenus lors du passage en clinique.

Les CAR-T cell restent une thérapie prometteuse et en constante évolution car dans un essai clinique publié au début de cette année dans le *New England Journal of Medicine*, deux des trois enfants atteints de leucémie lymphoblastique aiguë à LT en rechute ont obtenu une rémission complète de leur cancer dans le mois suivant le traitement par CAR-T cell à base modifiées. L'équipe, dirigée par l'immunologiste Waseem Qasim du Great Ormond Street Hospital de Londres, a ainsi montré qu'elle pouvait utiliser des techniques d'édition de base de manière sûre et efficace pour supprimer plusieurs gènes simultanément, contournant ainsi certains des principaux obstacles au déploiement des CAR-T cell contre les hémopathies malignes à LT agressifs. De plus, récemment un article a été publié et décrit le succès du traitement par CAR-T cell chez cinq patients atteints de lupus érythémateux disséminé sévère et résistant aux traitements conventionnels. Les patients ont présenté une maladie en sommeil pendant les 4 à 16 mois de suivi et d'autres caractéristiques de la maladie, dont la fibrose cardiaque et pulmonaires, avaient disparu avec des effets indésirables minimes. La rémission rapide et durable de la maladie représente une première application clinique de l'efficacité des thérapies cellulaires utilisant des CAR-T cell ciblant les LB dans le contexte des maladies auto-immunes.(76–79)

Le plus grand défi sera toutefois de rendre accessible le traitement aux personnes qui ont le plus de chances de survivre grâce à celui-ci. En effet, la production de cellules CAR T reste une thérapie très coûteuse pouvant aller jusqu'à des centaines de milliers d'euros par traitement. Les minorités sous représentées et les personnes défavorisées sur le plan socioéconomique courent un risque plus élevé de développer un cancer et d'en mourir. Elles ont également un accès limité aux essais cliniques en oncologie.(80)

Pour finir, les CAR-T cell sont un outil thérapeutique très passionnant, efficace et prometteur pour les personnes atteintes d'hémopathie malignes, et peut-être pour celles souffrant de tumeurs solides. Il est indéniable que cela entraînera de nombreuses études supplémentaires visant à répondre à toutes les questions en suspens.

Bibliographies

1. Zhang Y, Zhang Z. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. *Cell Mol Immunol.* août 2020;17(8):807-21.
2. Styczyński J. A brief history of CAR-T cells: from laboratory to the bedside. *Acta Haematologica Polonica.* 2020;51(1):2-5.
3. Russkamp N, Zenz T. The CAR T Cell Story. *healthbook TIMES Oncology Hematology.* 1 sept 2019;1(1):22-7.
4. Les cancers pédiatriques en France [Internet]. [cité 20 févr 2024]. Disponible sur: <http://pediatrie.e-cancer.fr/chercheur/acteurs-de-la-recherche/les-cancers-pediatriques-en-france>
5. Naing A, Hajar J, éditeurs. *Immunotherapy* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2020 [cité 20 oct 2023]. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 1244). Disponible sur: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-41008-7>
6. Thérapie par cellules CAR-T [Internet]. [cité 12 sept 2023]. Disponible sur: <https://www.hug.ch/hematologie/therapie-par-cellules-car-t>
7. Abbas AK (1944). *Basic immunology : functions and disorders of the immune system.* 2016.
8. Catros V. Les CAR-T cells, des cellules tueuses spécifiques d'antigènes tumoraux - De nouvelles générations pour le traitement des tumeurs solides. *Med Sci (Paris).* 1 avr 2019;35(4):316-26.
9. Labanieh L, Mackall CL. CAR immune cells: design principles, resistance and the next generation. *Nature.* févr 2023;614(7949):635-48.
10. Jayaraman J, Melody MP, Hou AJ, Desai RP, Fung AW, Pham AHT, et al. CAR-T design: Elements and their synergistic function. *EBioMedicine.* août 2020;58:102931.
11. Kröger N, Gribben J, Chabannon C, Yakoub-Agha I, Einsele H, éditeurs. *The EBMT/EHA CAR-T Cell Handbook* [Internet]. Cham (CH): Springer; 2022 [cité 21 sept 2023]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK584154/>
12. Moreno C, Haynie C, Cheever A, Weber KS. Alternative CAR Therapies: Recent Approaches in Engineering Chimeric Antigen Receptor Immune Cells to Combat Cancer. *Biomedicines.* juill 2022;10(7):1493.
13. Yun K, Siegler EL, Kenderian SS. Who wins the combat, CAR or TCR? *Leukemia.* oct 2023;37(10):1953-62.
14. Abou-el-Enein M, Elsallab M, Feldman SA, Fesnak AD, Heslop HE, Marks P, et al. Scalable Manufacturing of CAR T Cells for Cancer Immunotherapy. *Blood Cancer Discov.* 3 août 2021;2(5):408-22.
15. Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, Cui YK, Delbrook C, Feldman SA, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet.* 7 févr 2015;385(9967):517-28.
16. Lamers CHJ, Willemsen RA, Luider BA, Debets R, Bolhuis RLH. Protocol for gene transduction and expansion of human T lymphocytes for clinical immunogene therapy of cancer. *Cancer Gene Ther.* juill 2002;9(7):613-23.
17. Chin MHW, Norman MDA, Gentleman E, Coppens MO, Day RM. A Hydrogel-Integrated Culture Device to Interrogate T Cell Activation with Physicochemical Cues. *ACS Appl Mater Interfaces.* 21 oct 2020;12(42):47355-67.
18. Vormittag P, Gunn R, Ghorashian S, Veraitch FS. A guide to manufacturing CAR T cell therapies. *Current Opinion in Biotechnology.* oct 2018;53:164-81.
19. Labbé RP, Vessillier S, Rafiq QA. Lentiviral Vectors for T Cell Engineering: Clinical Applications, Bioprocessing and Future Perspectives. *Viruses.* 2 août 2021;13(8):1528.
20. Lu J, Jiang G. The journey of CAR-T therapy in hematological malignancies. *Mol Cancer.* 8 oct 2022;21:194.
21. Schanda N, Sauer T, Kunz A, Hüchelhoven-Krauss A, Neuber B, Wang L, et al. Sensitivity and Specificity of CD19-CAR-T Cell Detection by Flow Cytometry and PCR. *Cells.* 17 nov 2021;10(11):3208.
22. Liu J, Zhong JF, Zhang X, Zhang C. Allogeneic CD19-CAR-T cell infusion after allogeneic

- hematopoietic stem cell transplantation in B cell malignancies. *J Hematol Oncol.* 31 janv 2017;10:35.
23. Cappell KM, Kochenderfer JN. Long-term outcomes following CAR T cell therapy: what we know so far. *Nat Rev Clin Oncol.* juin 2023;20(6):359-71.
 24. Société française d'hématologie. *Hématologie* 4e édition. 2021.
 25. ANSM [Internet]. [cité 6 nov 2023]. Agence Nationale de sécurité du médicament et des produits de santé ANSM. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/>
 26. Résumé des caractéristiques du produit YESCARTA [Internet]. [cité 6 nov 2023]. Disponible sur: https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2023/20230724159647/anx_159647_fr.pdf
 27. Résumé des caractéristiques du produit KYMRIAHA [Internet]. [cité 6 nov 2023]. Disponible sur: https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2023/20230426158738/anx_158738_fr.pdf
 28. EMA. European Medicines Agency. [cité 23 oct 2023]. European Medicines Agency. Disponible sur: <https://www.ema.europa.eu/en>
 29. Résumé des caractéristiques du produit TECARTUS [Internet]. [cité 6 nov 2023]. Disponible sur: https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2023/20231009160387/anx_160387_fr.pdf
 30. Résumé des caractéristiques du produit ABECMA [Internet]. [cité 6 nov 2023]. Disponible sur: https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2023/20230623159336/anx_159336_fr.pdf
 31. VIDAL [Internet]. [cité 3 janv 2023]. VIDAL, L'intelligence médicale au service du soin. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/>
 32. Morris EC, Neelapu SS, Giavridis T, Sadelain M. Cytokine release syndrome and associated neurotoxicity in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* févr 2022;22(2):85-96.
 33. Freyer CW, Porter DL. Cytokine release syndrome and neurotoxicity following CAR T-cell therapy for hematologic malignancies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* nov 2020;146(5):940-8.
 34. Wang V, Gauthier M, Decot V, Reppel L, Bensoussan D. Systematic Review on CAR-T Cell Clinical Trials Up to 2022: Academic Center Input. *Cancers (Basel).* 4 févr 2023;15(4):1003.
 35. Guzman G, Reed MR, Bielamowicz K, Koss B, Rodriguez A. CAR-T Therapies in Solid Tumors: Opportunities and Challenges. *Curr Oncol Rep.* 2023;25(5):479-89.
 36. Loda M, Mucci LA, Mittelstadt ML, Hemelrijk MV, Cotter MB. *Pathology and Epidemiology of Cancer.* Springer; 2016. 664 p.
 37. Hinshaw DC, Shevde LA. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Res.* 15 sept 2019;79(18):4557-66.
 38. de Visser KE, Joyce JA. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. *Cancer Cell.* 13 mars 2023;41(3):374-403.
 39. Fumet JD, Ghiringhelli F. L'immunoediting enfin prouvé chez l'homme - La génétique au secours de l'immunothérapie. *Med Sci (Paris).* 1 août 2019;35(8-9):629-31.
 40. Kirchhammer N, Trefny MP, Auf der Maur P, Läubli H, Zippelius A. Combination cancer immunotherapies: Emerging treatment strategies adapted to the tumor microenvironment. *Sci Transl Med.* 9 nov 2022;14(670):eabo3605.
 41. Pagès F, Mlecnik B, Marliot F, Bindea G, Ou FS, Bifulco C, et al. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *The Lancet.* 26 mai 2018;391(10135):2128-39.
 42. Yan T, Zhu L, Chen J. Current advances and challenges in CAR T-Cell therapy for solid tumors: tumor-associated antigens and the tumor microenvironment. *Exp Hematol Oncol.* 27 janv 2023;12:14.
 43. O'Rourke DM, Nasrallah MP, Desai A, Melenhorst JJ, Mansfield K, Morrissette JJD, et al. A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. *Sci Transl Med.* 19 juill 2017;9(399):eaaa0984.
 44. Safarzadeh Kozani P, Safarzadeh Kozani P, Rahbarizadeh F. Addressing the obstacles of CAR T cell migration in solid tumors: wishing a heavy traffic. *Crit Rev Biotechnol.* nov 2022;42(7):1079-98.

45. van der Woude LL, Gorris MAJ, Halilovic A, Figdor CG, de Vries IJM. Migrating into the Tumor: a Roadmap for T Cells. *Trends Cancer*. nov 2017;3(11):797-808.
46. Nguyen DT, Ogando-Rivas E, Liu R, Wang T, Rubin J, Jin L, et al. CAR T Cell Locomotion in Solid Tumor Microenvironment. *Cells*. 20 juin 2022;11(12):1974.
47. Albelda SM. CAR T cell therapy for patients with solid tumours: key lessons to learn and unlearn. *Nat Rev Clin Oncol*. janv 2024;21(1):47-66.
48. Simula L, Ollivier E, Icard P, Donnadiou E. Immune Checkpoint Proteins, Metabolism and Adhesion Molecules: Overlooked Determinants of CAR T-Cell Migration? *Cells*. 6 juin 2022;11(11):1854.
49. Daei Sorkhabi A, Mohamed Khosroshahi L, Sarkesh A, Mardi A, Aghebati-Maleki A, Aghebati-Maleki L, et al. The current landscape of CAR T-cell therapy for solid tumors: Mechanisms, research progress, challenges, and counterstrategies. *Front Immunol*. 20 mars 2023;14:1113882.
50. Notarangelo G, Spinelli JB, Perez EM, Baker GJ, Kurmi K, Elia I, et al. Oncometabolite d-2HG alters T cell metabolism to impair CD8+ T cell function. *Science*. 30 sept 2022;377(6614):1519-29.
51. Wang Z, Moresco P, Yan R, Li J, Gao Y, Biasci D, et al. Carcinomas assemble a filamentous CXCL12–keratin-19 coating that suppresses T cell–mediated immune attack. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 25 janv 2022;119(4):e2119463119.
52. Gurbatri CR, Arpaia N, Danino T. Engineering bacteria as interactive cancer therapies. *Science*. 25 nov 2022;378(6622):858-64.
53. Vincent RL, Gurbatri CR, Li F, Vardoshvili A, Coker C, Im J, et al. Probiotic-guided CAR-T cells for solid tumor targeting. *Science*. 13 oct 2023;382(6667):211-8.
54. Wang G, Zhang Z, Zhong K, Wang Z, Yang N, Tang X, et al. CXCL11-armed oncolytic adenoviruses enhance CAR-T cell therapeutic efficacy and reprogram tumor microenvironment in glioblastoma. *Mol Ther*. 4 janv 2023;31(1):134-53.
55. Dong X, Ren J, Amoozgar Z, Lee S, Datta M, Roberge S, et al. Anti-VEGF therapy improves EGFR-vIII-CAR-T cell delivery and efficacy in syngeneic glioblastoma models in mice. *J Immunother Cancer*. 10 mars 2023;11(3):e005583.
56. Kosti P, Opzoomer JW, Larios-Martinez KI, Henley-Smith R, Scudamore CL, Okesola M, et al. Hypoxia-sensing CAR T cells provide safety and efficacy in treating solid tumors. *Cell Reports Medicine*. avr 2021;2(4):100227.
57. Ligtenberg MA, Mougiakakos D, Mukhopadhyay M, Witt K, Lladser A, Chmielewski M, et al. Coexpressed Catalase Protects Chimeric Antigen Receptor–Redirected T Cells as well as Bystander Cells from Oxidative Stress–Induced Loss of Antitumor Activity. *The Journal of Immunology*. 15 janv 2016;196(2):759-66.
58. Mane MM, Cohen IJ, Ackerstaff E, Shalaby K, Ijoma JN, Ko M, et al. Lactate Dehydrogenase A Depletion Alters MyC-CaP Tumor Metabolism, Microenvironment, and CAR T Cell Therapy. *Molecular Therapy - Oncolytics*. 25 sept 2020;18:382-95.
59. Sun T, Liu B, Li Y, Wu J, Cao Y, Yang S, et al. Oxamate enhances the efficacy of CAR-T therapy against glioblastoma via suppressing ectonucleotidases and CCR8 lactylation. *J Exp Clin Cancer Res*. 29 sept 2023;42:253.
60. Mardiana S, Solomon BJ, Darcy PK, Beavis PA. Supercharging adoptive T cell therapy to overcome solid tumor–induced immunosuppression. *Science Translational Medicine*. 5 juin 2019;11(495):eaaw2293.
61. Narayan V, Barber-Rotenberg JS, Jung IY, Lacey SF, Rech AJ, Davis MM, et al. PSMA-targeting TGFβ-insensitive armored CAR T cells in metastatic castration-resistant prostate cancer: a phase I trial. *Nat Med*. avr 2022;28(4):724-34.
62. Ma L, Hostetler A, Morgan DM, Maiorino L, Sulkaj I, Whittaker CA, et al. Vaccine-boosted CAR T crosstalk with host immunity to reject tumors with antigen heterogeneity. *Cell*. 20 juill 2023;186(15):3148-3165.e20.
63. Liu Y, An L, Huang R, Xiong J, Yang H, Wang X, et al. Strategies to enhance CAR-T persistence. *Biomark Res*. 23 nov 2022;10(1):86.
64. 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors | *Nature Medicine* [Internet]. [cité 12 déc 2023]. Disponible sur:

<https://www.nature.com/articles/nm.3838>

65. Drougkas K, Karampinos K, Karavolias I, Koumprentziotis IA, Ploumaki I, Triantafyllou E, et al. Comprehensive clinical evaluation of CAR-T cell immunotherapy for solid tumors: a path moving forward or a dead end? *J Cancer Res Clin Oncol*. 2023;149(6):2709-34.
66. Ahmed N, Brawley V, Hegde M, Bielasowicz K, Kalra M, Landi D, et al. HER2-Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified Virus-Specific T Cells for Progressive Glioblastoma: A Phase 1 Dose-Escalation Trial. *JAMA Oncol*. 1 août 2017;3(8):1094-101.
67. Sridaran D, Bradshaw E, DeSelm C, Pachynski R, Mahajan K, Mahajan NP. Prostate cancer immunotherapy: Improving clinical outcomes with a multi-pronged approach. *Cell Reports Medicine*. 17 oct 2023;4(10):101199.
68. Yu L, Huang L, Lin D, Lai X, Wu L, Liao X, et al. GD2-specific chimeric antigen receptor-modified T cells for the treatment of refractory and/or recurrent neuroblastoma in pediatric patients. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2022;148(10):2643-52.
69. STRONCEK DF, REN J, LEE DW, TRAN M, FRODIGH SE, SABATINO M, et al. Myeloid cells in peripheral blood mononuclear cell concentrates inhibit the expansion of chimeric antigen receptor T cells. *Cytotherapy*. juill 2016;18(7):893-901.
70. Majzner RG, Ramakrishna S, Yeom KW, Patel S, Chinnasamy H, Schultz LM, et al. GD2-CAR T cell therapy for H3K27M-mutated diffuse midline gliomas. *Nature*. mars 2022;603(7903):934-41.
71. Ramaswamy V, Taylor MD. CAR T cells for childhood diffuse midline gliomas. *Nat Med*. mai 2018;24(5):534-5.
72. Thomas BC, Staudt DE, Douglas AM, Monje M, Vitanza NA, Dun MD. CAR T cell therapies for diffuse midline glioma. *Trends in Cancer*. 1 oct 2023;9(10):791-804.
73. Qi C, Gong J, Li J, Liu D, Qin Y, Ge S, et al. Claudin18.2-specific CAR T cells in gastrointestinal cancers: phase 1 trial interim results. *Nat Med*. juin 2022;28(6):1189-98.
74. Vitanza NA, Wilson AL, Huang W, Seidel K, Brown C, Gustafson JA, et al. Intraventricular B7-H3 CAR T Cells for Diffuse Intrinsic Pontine Glioma: Preliminary First-in-Human Bioactivity and Safety. *Cancer Discovery*. 9 janv 2023;13(1):114-31.
75. Del Bufalo F, De Angelis B, Caruana I, Del Baldo G, De Ioris MA, Serra A, et al. GD2-CART01 for Relapsed or Refractory High-Risk Neuroblastoma. *New England Journal of Medicine*. 6 avr 2023;388(14):1284-95.
76. Dolgin E. Super-resistant CAR Ts take on cancers. *Nature Biotechnology*. 1 janv 2024;42(1):5-7.
77. Mackensen A, Müller F, Mougiakakos D, Böltz S, Wilhelm A, Aigner M, et al. Anti-CD19 CAR T cell therapy for refractory systemic lupus erythematosus. *Nat Med*. oct 2022;28(10):2124-32.
78. Chiesa R, Georgiadis C, Syed F, Zhan H, Etuk A, Gkazi SA, et al. Base-Edited CAR7 T Cells for Relapsed T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 7 sept 2023;389(10):899-910.
79. Müller F, Taubmann J, Bucci L, Wilhelm A, Bergmann C, Völkl S, et al. CD19 CAR T-Cell Therapy in Autoimmune Disease — A Case Series with Follow-up. *New England Journal of Medicine*. 22 févr 2024;390(8):687-700.
80. Badr H, Rouce R, Scheurer ME, Lulla P, Mims M, Reddy P. Bringing CAR T cell therapy trials to underserved populations. *Cancer Cell*. 11 déc 2023;41(12):2007-10.



FICHE SINALETIQUE

Nom : RAUSCH

Prénom : Marie

Nom d'usage (marital ou autre) : RAUSCH-AMRHEIN

Né(e) le : 26 janvier 1998

Titre de la thèse :

Les CAR-T Cell dans les tumeurs solides

Date et lieu de la soutenance : 30 avril 2024, Faculté de Pharmacie de Strasbourg
N° d'ordre : 2356

Résumé :

La thérapie des CAR-T cell a permis de révolutionner le traitement des cancers hématologiques. Un tel succès a suscité un vif intérêt pour l'application de cette technologie dans d'autres cancers. Cependant, des défis majeurs persistent, notamment la capacité limitée des cellules à migrer dans les tumeurs, le microenvironnement tumoral hostile, l'épuisement des lymphocytes T et les effets secondaires toxiques sévères. Pour surmonter ces obstacles, des progrès sont en train d'être réalisés dans l'ingénierie des CAR, dans l'utilisation combinée de plusieurs thérapies et dans les procédés de fabrications. Ce mémoire explore les antigènes ciblés par les CAR-T cell dans les essais cliniques en cours et propose des stratégies pour améliorer leur efficacité dans le traitement des tumeurs solides.

Mots-clés :

CAR-T cell / Oncologie / Immunologie / Tumeur / Traitement / Biotechnologie