



HAL
open science

Un néolymphocyte T pour une thérapie médicamenteuse de demain : “ espoir ou réalité ”

Quentin Gardan

► **To cite this version:**

Quentin Gardan. Un néolymphocyte T pour une thérapie médicamenteuse de demain : “ espoir ou réalité ”. Sciences du Vivant [q-bio]. 2017. dumas-01812056

HAL Id: dumas-01812056

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01812056>

Submitted on 11 Jun 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE D'EXERCICE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

Thèse en vue du
DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée par

Quentin Gardan

**Un néolymphocyte T
pour une thérapie
médicamenteuse de
demain : “ Espoir ou réalité ”**

**Thèse soutenue à Rennes
le 27 octobre 2017**

devant le jury composé de :

Professeur Ahmad FAILI

Professeur, Université de Rennes 1 /
Président et directeur de thèse

Docteur Sarah DION

Maître de conférence, Université de Rennes 1 /
examineur

Docteur Noëlle DAVOUST

Pharmacien d'officine / *examineur*

**Liste des enseignants-chercheurs de la faculté des sciences
pharmaceutiques et biologiques pour l'année universitaire de
soutenance au 1^{er} septembre 2017**

Professeurs

BOUSTIE Joël
BURGOT Gwenola
DONNIO Pierre Yves
FAILI Ahmad
FARDEL Olivier
FELDEN Brice
GAMBOROTA Giulio
GOUGEON Anne
LAGENTE Vincent
LE CORRE Pascal
LORANT (BOICHOT) Elisabeth
MOREL Isabelle
SERGENT Odile
SPARFEL-BERLIVET Lydie
TOMASI Sophie
URIAK Philippe
VAN DE WEGHE Pierre
VERNHET Laurent

Professeurs Associés

BUREAU Loïc
DAVOUST Noëlle

Professeurs Emérites

CILLARD Josine
GUILLOUZO André

Maitres de conférences

ABASQ-PAOFI marie-Laurence
ANINAT Caroline
AUGAGNEUR Yoann
BEGRICHE Karima
BOUSARGHIN Latifa
BRANDHONNEUR Nolwenn
BRUYERE Arnaud
BUNETEL Laurence
CHOLLET-KRUGLER Marylène
COLLIN Xavier
CORBEL Jean-Charles

DAVID Michèle
DELALANDE Olivier
DELMAIL David
DION Sarah
DOLLO Gilles
GICQUEL Thomas
GILOT David
GOUAULT Nicolas
HITTI Eric
JEAN Mickaël
JOANNES Audrey
LEUREUR Valerie
LE FERREC Eric
LE PABIC Hélène
LEGOUIN-GARGADENNEC Béatrice
LOHEZIC-LE DEVEHAT Françoise
MARTIN-CHOULY Corinne
MINET Jacques
NOURY Fanny
PINEL-MARIE Marie-laure
PODECHARD Normand
POTIN Sophie
RENAULT Jacques
ROUILLON Astrid

ATER

HATAHET Taher
COUM Amandine

Serment de Galien

En présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples, je jure :

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 jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque

Remerciements

*Je remercie le **Professeur FAILI Ahmad** d'avoir accepté l'encadrement de ma thèse et de surcroît présider mon jury. La nutealisation des pathogènes ne sont pas près de s'effacer de ma mémoire.*

*Je remercie le **Docteur DAVOUST Noëlle** de participer à mon jury de thèse. Depuis ma deuxième année, j'ai effectué mes stages en pharmacie d'officine chez vous. Malgré mon parcours atypique vous avez toujours su me donner le goût et l'envie d'être un futur praticien du médicament.*

*Je remercie le **Docteur DION Sarah** pour avoir accepté d'être membre du jury et d'avoir porté un intérêt au sujet. Sincères remerciements.*

*A **ma famille** un grand merci de m'avoir soutenu. Mes parents qui ont eu la patience de me garder chez eux, de toujours croire en moi et de m'aimer. Pauline (ma petite sœur jumelle), Benjamin et Erwan, non sans humour, vous m'avez soutenu et aidé. Tout particulièrement Erwan un jour m'a dit "Et si tu faisais pharma ?" Je me suis dit pourquoi pas, merci.*

*A **mes amis Cessonais**, Maxime, Vincent, Thibault, Coralie, Estelle et Lucie de m'avoir supporté toutes ces années et de continuer. C'est l'apanage ou adage de notre amitié.*

*A **mes amis de pharma et de médecine**, autant de fous rires, de joie et de bonheur avec vous. Beaucoup de soirées (-OH) sont passées depuis ma P2, ces souvenirs resteront gravés toute ma vie. Des moments inoubliables pour tous les conter, le muevelo chorée officielle des pharma, les week-ends à Brétignolles et les tonus mousses.*

*A **Marion** merci de ton soutien précieux, de ta gentillesse pendant ces deux années de dur labeur. Tout simplement d'être là pour moi.*

Et si on essayait d'être heureux ne serait-ce que pour montrer l'exemple ...

Table des matières

Table des matières.....	6
Liste des figures	11
Liste des tableaux.....	12
Liste des abréviations	13
Introduction.....	17
Partie 1 : L'immunologie une arme contre le cancer	19
1.1 Approche de l'immunologie	19
1.1.1 Historique.....	19
1.1.2 Définition	20
1.1.3 La réponse immunitaire innée.....	20
1.1.4 Lien entre immunité innée et adaptative	21
1.1.4.1 Cellule dendritique.....	22
1.1.5 La réponse immunitaire adaptative	23
1.2 Les acteurs de l'immunité adaptative	24
1.2.1 Le lymphocyte T	24
1.2.1.1 Ontogénèse des lymphocytes thymo-dépendants	24
1.2.1.2 Récepteur des cellules T	26
1.2.1.3 Activation des lymphocytes T	27
1.2.1.4 Co-stimulation des lymphocytes T	27
1.2.1.5 Le troisième signal.....	28
1.2.1.6 Phénomène de tolérance périphérique	28
1.2.1.7 Les sous populations de lymphocytes T	29
1.2.1.8 Lymphocyte T CD8	29
1.2.1.9 Lymphocyte T CD4	29
1.2.1.9.1 Lymphocyte Th ₁	30
1.2.1.9.2 Lymphocyte Th ₂	31
1.2.1.9.3 Lymphocyte Th ₁₇	31
1.2.1.9.4 Lymphocytes T régulateurs.....	32
1.2.1.10 Les lymphocytes T mémoires	33
1.2.2 Lymphocytes B.....	33

1.2.2.1	Maturation des Lymphocytes B	34
1.2.2.2	Récepteurs des cellules B.....	34
1.2.2.3	L'activation thymo-dépendante ou indépendante des lymphocytes B	35
1.2.2.4	Fonction des Lymphocytes B.....	35
1.3	Le cancer : la maladie du siècle	37
1.3.1	Caractéristique d'une cellule cancéreuse	37
1.3.2	Tumeur bénigne et tumeur maligne	38
1.3.3	La cancérogenèse	38
1.3.3.1	Le processus d'initiation tumoral.....	39
1.3.3.2	Le processus de promotion tumoral.....	39
1.3.3.3	Le processus de prolifération tumorale.....	40
1.3.4	Mécanisme de défense cellulaire	40
1.3.4.1	Mécanismes intrinsèques	40
1.3.4.2	Mécanismes extrinsèques.....	40
1.4	La réponse immunitaire face au cancer	41
1.4.1	Concepts d'immunogénicité, d'immunosurveillance et d'immunoédition.....	41
1.4.2	La reconnaissance des cellules tumorales : l'immunogénéicité.....	43
1.4.2.1	Les antigènes associés à la tumeur.....	43
1.4.2.2	L'établissement d'une barrière physique	43
1.4.2.3	L'état du micro-environnement tumoral	43
1.4.3	La réponse anti-tumorale du système immunitaire : l'immunosurveillance....	44
1.4.3.1	Les acteurs de l'immunité innée	44
1.4.3.1.1	Les cellules Natural killer	45
1.4.3.1.2	Les cellules Natural Killer T.....	45
1.4.3.1.3	Macrophages associés aux tumeurs	46
1.4.3.1.3.1	Macrophages associés aux tumeurs de type 1.....	46
1.4.3.1.3.2	Macrophages associés aux tumeurs de type 2.....	46
1.4.3.1.4	Polynucléaires neutrophiles	47
1.4.3.1.4.1	Neutrophiles associés à la tumeur N1	47
1.4.3.1.4.2	Neutrophiles associés à la tumeur N2.....	48
1.4.3.1.5	Cellules dendritiques.....	48
1.4.3.1.6	Cellules myéloïdes suppressives.....	48
1.4.3.2	Les acteurs de l'immunité adaptative	49

1.4.3.2.1	Les lymphocytes T	49
1.4.3.2.1.1	Lymphocytes T CD8	49
1.4.3.2.1.2	Lymphocytes Th ₁	50
1.4.3.2.1.3	Lymphocytes Th ₂	50
1.4.3.2.1.4	Lymphocyte Th ₁₇	51
1.4.3.2.1.5	Lymphocytes Treg	51
1.4.3.2.2	Lymphocytes B	52
1.4.3.3	Inflammation	52
1.4.3.3.1	La voie intrinsèque et extrinsèque	52
1.4.3.3.2	Une réponse inflammatoire anti-tumorale	53
1.4.3.3.3	Une inflammation au service de la tumeur	53
1.4.4	Echappement au système immunitaire	53
1.4.4.1	Modifications intrinsèques des cellules tumorales	54
1.4.4.2	Mécanisme indirecte d'immunosubversion et d'immunosuppression	54
1.4.4.2.1	Recrutement de cellules régulatrices	54
1.4.4.2.2	Les cytokines protumorales	55
1.5	Immunothérapie	56
1.6	La thérapie cellulaire adoptive à base de lymphocyte T	57
1.6.1	Définition	57
1.6.2	Les lymphocytes infiltrant la tumeur	58
1.6.3	Les lymphocytes T induits par les antigènes associés aux tumeurs	58
1.6.4	Thérapie à base de lymphocyte T modifié génétiquement	59
1.6.4.1	Synthèse du lymphocyte T	59
1.6.5	Développement de cellules T avec un récepteur d'origine artificielles	61
Partie 2 : Lymphocyte T à récepteur d'antigène chimérique		62
2.1	Structure	63
2.1.1	Structure de base	63
2.1.1.1	Première génération	65
2.1.1.2	Deuxième génération	65
2.1.1.3	Troisième génération	66
2.1.2	Rôle de la pharmacodynamique dans l'activation des CAR-T cells	67
2.1.2.1	Le domaine extracellulaire	68
2.1.2.2	Les domaines transmembranaires : Charnière et domaine d'espacement ...	68

2.1.2.3	Les domaines intracellulaires.....	68
2.1.2.4	Domaine de co-stimulation.....	69
2.2	Synthèse des CAR-T cell.....	72
2.2.1	Source de lymphocyte T.....	73
2.2.2	Activation des lymphocytes T.....	75
2.2.3	Modification génétique des CAR-T cell.....	75
2.2.3.1	Les vecteurs viraux.....	76
2.2.3.2	La méthode électroposon / électroporase.....	77
2.2.3.3	Expression transitoire du CAR.....	79
2.2.4	Expansion cellulaire.....	79
2.2.5	Formulation du produit fini.....	80
2.3	La toxicité de CAR-T cell.....	82
2.3.1	Toxicité.....	82
2.3.1.1	Le syndrome de relargage des cytokines.....	82
2.3.1.2	Toxicité neurologique.....	83
2.3.1.3	Effet hors cible.....	83
2.3.1.4	Réaction immune : Anaphylaxie et maladie de l'hôte contre le greffon.....	85
2.3.1.5	Oncogenèse insertionnelle.....	85
2.3.2	Réduction de la toxicité des CAR-T cells.....	86
2.3.2.1	Optimisation des liaisons antigène-récepteurs.....	87
2.3.2.2	Activation ciblée : double CAR et CAR inhibiteur.....	87
2.3.2.3	Expression transitoire d'un récepteur d'antigène chimérique.....	87
2.3.2.4	Gène suicide.....	88
2.3.2.4.1	Gène thymidine kinase.....	88
2.3.2.4.2	Caspase 9 inductible.....	88
2.3.2.5	Récepteur tronqué.....	89
2.4	Devenir in vivo de CAR-T Cells.....	90
2.4.1	Dosage et administration.....	90
2.4.2	Distribution des CAR-T cells.....	90
2.4.3	Améliorer in vivo la persistance à long terme.....	91
2.4.3.1	Résistance à l'apoptose.....	91
2.4.3.2	Rôle de la différenciation et du phénotype mémoire.....	92
2.4.3.3	Rôle du conditionnement, la lymphodéplétion.....	93

2.5	Nouveaux modèles de CAR.....	95
2.5.1	CAR universel.....	95
2.5.2	Banque de CAR-T cell.....	95
2.5.3	T cells Redirected for Universal Cytokine Killing	96
2.5.4	Autres conceptions de CAR-T cell	97
2.6	Le CAR exprimé chez d'autres types cellulaires	98
2.6.1	Lymphocyte T à TCR $\gamma\delta$	98
2.6.2	Cellule NK	98
2.6.3	Les progéniteurs lymphoïdes	99
2.7	Donnée clinique	100
2.7.1	Hémopathie maligne	101
2.7.1.1	CAR-T cell anti-CD19 et leucémie lymphoïde aigue à cellule B.....	101
2.7.1.2	CAR-T cell anti-CD19 et leucémie lymphoïde chronique	102
2.7.1.3	CAR-T cell anti-CD19 et lymphome.....	102
2.7.1.4	CAR-T cell anti-CD19 et myélome multiple.....	103
2.7.1.5	Autres cibles des CAR-T cells dans les hémopathies.....	103
2.7.2	Kymriah®	104
2.7.3	Les tumeurs solides.....	104
2.7.3.1	Les obstacles à une thérapie de CAR-T cell efficace	104
2.7.3.1.1	Faible infiltration des CAR-T cells au niveau tumoral.....	105
2.7.3.1.2	Une action chirurgicale sur les tumeurs solides.....	105
2.7.3.1.3	D'un environnement immunosuppresseur à un environnement antitumoral.....	106
2.7.3.1.4	Une combinaison d'immunothérapie.....	106
2.7.3.2	Donnée cliniques.....	107
	Conclusion	108
	Annexes.....	109
	Bibliographie.....	114

Liste des figures

<i>Figure 1: Représentation des cellules du système immunitaire</i> ²	20
<i>Figure 2 : Schéma de l'activation du système immunitaire après une infection</i> ¹	22
<i>Figure 3 : Développement des lymphocytes T</i> ¹	25
<i>Figure 4 : Structure d'un TCR $\alpha\beta$</i> ²	26
<i>Figure 5 : Les co-récepteurs d'une synapse immunologique</i> ⁶	28
<i>Figure 6: Différenciation des sous-populations auxiliaires</i> ¹	30
<i>Figure 7 : Schéma du processus de cancerogenèse</i> ¹⁶	39
<i>Figure 8 : Schéma des 3 phases de l'immunoédition</i> ¹	42
<i>Figure 9 : Les étapes de réalisation d'un transfert de lymphocytes T modifiés</i> ⁵⁰	60
<i>Figure 10 : Structure d'un récepteur d'antigène chimérique</i> ⁵²	63
<i>Figure 11 : Schéma de base d'un CAR</i> ⁵⁷	64
<i>Figure 12 : Les différentes générations de CAR-T cells</i> ⁵⁵	64
<i>Figure 13 : Schéma d'un CAR de 1^{ère} génération</i> ⁵²	65
<i>Figure 14 : Schéma d'un CAR de 2^{ème} génération à domaine de co-stimulation CD28</i> ⁵²	66
<i>Figure 15 : Un récepteur d'antigène chimérique</i> ⁶¹	67
<i>Figure 16 : Cascade de transduction du signal du CAR-T cell</i> ⁴⁸	69
<i>Figure 17 : Signalisation intracellulaire médiée par CD28 et 4-1BB dans les cellules CAR.</i> ⁷⁰	70
<i>Figure 18 : Schéma des étapes de synthèse d'un CAR-T cell et des exemples de technologies disponibles</i> ⁶⁶	72
<i>Figure 19 : Schéma de sang périphérique séparé par leucaphérèse</i> ⁶⁷	73
<i>Figure 20 : Les méthodes de sélection des lymphocytes après aphérèse</i> ⁶⁷	74
<i>Figure 21 : Schéma de l'intégration d'un gène par le système transposon/transposase</i> ⁷⁰	78
<i>Figure 22 : La toxicité hors cible des CAR-T cell</i> ⁸²	84
<i>Figure 23 : Modification structurale de CAR-T cell pour réduire la toxicité</i> ⁸²	86
<i>Figure 24 : Schéma de CAR-T cells muni du système icas9</i> ⁵⁶	89
<i>Figure 25 : CAR-T cell non immunogénique</i> ⁸⁵	96
<i>Figure 26: Les antigènes utilisés dans la thérapie adoptive à base de lymphocyte T</i> ¹³⁰	100

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Prix Nobel attribué à la recherche en immunologie innée et adaptative</i> ¹	109
<i>Tableau 2 : Les différentes caractéristiques de l'immunité</i> ¹	110
<i>Tableau 3 : Liste non exhaustif d'essais cliniques obtenue par des ACT</i> ¹⁴	110
<i>Tableau 4 : Différents essais cliniques de CAR-T cell anti-CD19 enregistré en 2016</i> ⁵⁷	111
<i>Tableau 5 : La toxicité générale de CAR-T cell anti-CD19</i>	112
<i>Tableau 6 : Les Cibles de CAR-T cell pour le traitement des hémopathie malignes</i> ⁵⁵	112
<i>Tableau 7 : Essais cliniques en cours de CAR-T cell ciblant des cancers solides</i> ¹³⁰	113

Liste des abréviations

4-1BB	: Antigène CD137
ACT	: Adoptive cellular therapy
ADCC	: Antibody dependant cell cytotoxicity
ADN	: Acide désoxyribonucléique
Ag	: Antigène
AICD	: Activation induced cell death
ARN	: Acide ribonucléique
ARNm	: ARN messenger
ASK1	: Apoptosis signal-regulating kinase 1
ATF2	: Activating transcription factor 2
Bcl-xL	: B-cell lymphoma-extra large
BCR	: Récepteurs des cellules B
CAN	: Calcineurine
CAR	: Récepteur d'antigène chimérique
CAR-T cell	: Lymphocyte T à récepteur d'antigène chimérique
CCR7	: Récepteur aux chimiokines au motif C-C type 7
CD	: Cluster of differenciation
CMH-I	: Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CMH-II	: Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
CPA	: Cellule présentatrices d'antigènes
CRISPR/CAS 9	: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats associate system 9
CSF1	: Colony stimulating factor 1
CTLA4	: Cytotoxic T lymphocyte associated protein 4
CXCL	: Motif C-X-C chiniokine ligand
CXCR3	: Récepteur aux chimiokines
DAG	: Diacylglycérol
DAP 12	: DNAX-Activation protein 12
EGFR	: Epidermal growth factor receptor

Fas	: Apoptosis Stimulating Fragment
FasL	: Apoptosis Stimulating Fragment Ligand
FcγRIII	: CD16
FDA	: Food drug administration p46
FLIP	: FADD-like apoptosis regulator
GD2	: Disialoganglioside de type 2
GM-CSF	: Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
Grb2	: Growth factor receptor bound protein 2
FLT-3	: FMS- related tyrosine kinase 3
GVHD	: Maladie du greffon contre l'hôte
HER-2	: Human epidermal growth factor receptor 2
IκB	: Inhibitor protein of NF-κB
ICAM-I	: InterCellular Adhesion Molecule 1
iCas9	: Caspase 9 inductible
ICOS ligand	: Inductible costimulator ligand
IDO	: Indoleamine 2,3-dioxygénase
EGF	: Epidermal growth factor
TAN	: Tumor associated neutrophils
MDSC	: Cellule myéloïde suppressive
IFN-γ	: Interféron gamma
Ig	: Immunoglobuline
ITAM	: Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs
ITR	: Répétition terminal inverse
JNK	: C-Jun N-terminal kinase
LAT	: Linker for activation of T cell
LB	: Lymphocyte B
Lck	: Lymphocyte-specific protein
LFA-1	: Lymphocyte function-associated antigen 1
LH	: Lymphome hodgkinien
LLA	: Leucémie lymphoïde aigue ou chronique
LLC	: Leucémie lymphoïde chronique,
LNH	: Lymphome non hodgkinien
LPS	: Lipopolysaccharides

LT	: Lymphocyte T
LTC	: Lymphocyte T cytotoxique
LT _{EM}	: Lymphocytes T effecteur mémoire
LTh	: Lymphocyte T helper
LTh _f	: Lymphocyte T helper folliculaire
LT _{MC}	: Lymphocyte T mémoire centraux
LTreg	: Lymphocyte T régulateur
M-CSF	: Macrophage colony stimulating factor
MAGEA1	: Melanoma associated antigen A1
MAKK	: MAP kinase kinase
MAPK	: Mitogen activated protein kinase
MM	: Myélome multiple
MSKCC	: Memorial Sloan Kettering Cancer center
mTOR	: Mechanistic target of rapamycin
NER	: Nucleotide excision repair
NF- κ B	: Nuclear factor kappa B
NFAT	: Facteur nucléaire des lymphocytes T activés
NFAT	: Nuclear factor of activated T-cell
NK	: Natural Killer
NK T	: Cellules T natural killer
NKG2D	: Natural killer group 2D receptor p41
p38	: MAPK P38
PD1	: Programmed death receptor 1
PDL1	: Programmed death-ligand 1
PDL2	: Programmed death-ligand 1
PI3-K	: Phosphoinositide 3-kinase
PIP3	: Phosphatidylinositol- (3,4,5)-trisphosphate
PKC α	: Protéine kinase C alpha
PKC- θ	: Protéine kinase C thêta
PLC γ 1	: Phospholipase C gamma 1
PRR	: Pattern recognition receptor
scFv	: Chaîne légère d'un fragment variable d'un anticorps
SI	: Système immunitaire

SLP76	: Lymphocyte cytosolic protein 2
SRC	: Syndrome de libération des cytokines
TAA	: Antigènes associés à la tumeur
TAL1	: Transcription activator-like effector nuclease
TAM	: Macrophage associés aux tumeurs
TCR	: Récepteur des cellules T
TGF- β	: Transforming growth factor beta
TIL	: lymphocyte infiltrant la tumeur
TIM 3	: T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3
TK	: Thymidine kinase
TLR	: Toll like receptor
TNF	: Tumor necrosis factor
TRAF1	: TNF receptor-associated factor 1
TRAF2	: TNF receptor-associated factor 1
TRAIL	: Tumor necrosis factor related apoptosis ligand
TRUCK	: T cells Redirected for Universal Cytokine Killing
VEGF	: Vascular endothelial growth factor
VEGFR	: Vascular endothelial growth factor receptor
VH	: Chaîne lourde
VL	: Chaîne légère
VLA-4	: Very late antigen 4
ZAP-70	: Zeta associated protein
α	: Alpha
β	: Beta
γ	: Gamma
γ -rétroviraux	: Gamma-retrovirus
δ	: Delta
ϵ	: Epsilon

Introduction

En 2015, 8,8 millions de personnes sont décédées dans le monde du cancer selon l'organisation mondiale de la santé, soit un individu sur six. Les cancers les plus fréquents chez la femme sont le cancer du sein, du poumon, colorectal, du col de l'utérus et de l'estomac, alors que chez l'homme les plus fréquents sont le cancer du poumon, du foie, de l'estomac, colorectal et de la prostate.

Pendant des dizaines d'années, le traitement du cancer est resté basé sur la triade : chimiothérapie, chirurgie et radiothérapie. La mortalité des cancers et les effets indésirables lourds subsistent et demeurent un défi pour le siècle à venir. L'immunothérapie comme nouvelle thérapeutique a connu un engouement depuis la fin du XXème siècle. Le système immunitaire nous protège contre une agression, détruit les pathogènes et les cellules infectées. Pourquoi les cellules tumorales ne sont-elles pas reconnues par celui-ci. Au commencement, l'immunité est anti-tumorale. En détruisant toujours plus de cellules cancéreuses, notre système immunitaire sélectionne les phénotypes les plus robustes. Parallèlement, les cellules immunitaires et cancéreuses sécrètent de nombreuses substances pro-tumorales. Cet ensemble conduit à l'inversion du système immunitaire pour devenir pro-tumoral. Le cancer échappe à toute régulation de l'organisme. Ce processus est appelé immunoédition. Une meilleure compréhension de ce phénomène est indispensable pour perfectionner l'approche thérapeutique.

L'utilisation de la résilience du système immunitaire est l'un des axes de recherche pour lutter contre le cancer. L'essor de l'immunothérapie a été fulgurant. En 1998, un anticorps monoclonal ciblant le marqueur CD20 (cluster of differentiation) fut autorisé pour le traitement du lymphome folliculaire. Au cours de la dernière décennie, la thérapie adaptative de cellule T modifiées est devenue l'une des stratégies les plus prometteuses dans l'immunothérapie. En 2014, elle est reconnue par la Food and Drug Administration des Etats-Unis comme « thérapie innovante ». Il S'agit de lymphocytes T autologues modifiés génétiquement exprimant un récepteur d'antigène chimérique (CAR) assurant le ciblage spécifique d'un antigène et sa destruction de la cellule. Actuellement, plus de cent patients ont été traités grâce à cette thérapie, majoritairement pour des hémopathies malignes exprimant l'antigène CD19.

Comment la conception, le développement d'un lymphocyte T CAR en fait-elle un médicament de demain ?

La première partie sera consacrée à la description du système immunitaire, de la cancérogénèse et l'interdépendance entre ses entités. Dans une deuxième partie, je développerais la conception, les succès, les défis et l'avenir des thérapies de lymphocyte T CAR.

Partie 1 : L'immunologie une arme contre le cancer

L'immunologie est une science récente du début de XX^{ème} siècles. L'étude du système immunitaire et des liens avec le cancer a permis une meilleure compréhension des mécanismes. Son application au sein de l'arsenal thérapeutique est apparue dans les années 90. Nous étudierons ce qu'est le système immunitaire et plus précisément ce que sont les lymphocytes T. La cancérogenèse et le phénomène d'immunoédition seront également développés. Enfin, nous verrons le début de la thérapie adaptative à base de lymphocytes T.

1.1 Approche de l'immunologie

1.1.1 Historique

L'immunologie, en tant que discipline, s'est développée à partir du constat que des individus guéris de certaines maladies infectieuses étaient par la suite protégés contre ces mêmes maladies. Le terme latin *immunis*, qui signifie « dispensé de, exempté de », est à l'origine du mot « immunité » indiquant un état de protection contre une maladie infectieuse. La plus ancienne référence à l'immunité remonte à Thucydide, historien de la Grèce antique. Dans sa description d'une épidémie de peste sévissant à Athènes, il écrit, en 430 avant Jésus Christ, que seuls ceux guérissant de cette peste pourraient prendre soin des malades, car ils ne contracteraient plus la maladie une seconde fois ¹. Bien que le phénomène de l'immunité ait déjà été reconnu par les sociétés de l'antiquité, il aura fallu attendre deux millénaires pour que ce concept soit converti avec succès en une pratique médicale efficace.

Les premiers essais menés par les chinois et les turcs au XV^{ème} siècle, avaient pour but de prévenir la variole. Cette technique a été considérablement améliorée par le médecin anglais Edward Jenner en 1798. Il observa que les trayeuses contractant la variole de la vache ou vaccine, une maladie bénigne, étaient par la suite immunisées contre la variole. Le docteur Jenner émit l'hypothèse que l'inoculation du liquide d'une pustule de vaccine à l'Homme pouvait protéger contre la variole. L'essai sur un enfant de huit ans fut fructueux ¹.

Un siècle plus tard, Louis Pasteur s'intéressa au choléra. Son expérience sur les poules démontra qu'une souche affaiblie pouvait être administrée pour protéger de la maladie. Cette souche atténuée fût nommée « vaccin » (du latin *vacca* signifiant « vache ») en l'honneur des travaux de Jenner. En 1890, le travail expérimental d'Emil Von Behring et de Shibassaburo

Kitasato donna un premier aperçu des mécanismes de l'immunité, ce qui valut à Von Behring le prix Nobel de médecine en 1901 (tableau 1).

1.1.2 Définition

Le système immunitaire (SI) est un réseau dynamique d'organes, de cellules (Figure 1) et de molécules, afin d'assurer à l'organisme une protection continue contre les agressions, tout en évitant des réactions contre le « soi ». Ce système agit contre les agressions infectieuses, parasitaires et les cellules malignes ¹. Cependant, les réactions immunitaires ne sont pas toujours favorables. Elles peuvent entraîner des réactions d'hypersensibilité, par exemple sous forme de choc anaphylactique ou d'une maladie auto-immune, lorsque le SI agit contre ses propres tissus ¹. La réponse immunitaire peut être scindée en deux réponses : l'immunité innée et l'immunité adaptative (Tableau 2) ; ces deux ensembles collaborent étroitement pour protéger l'organisme.

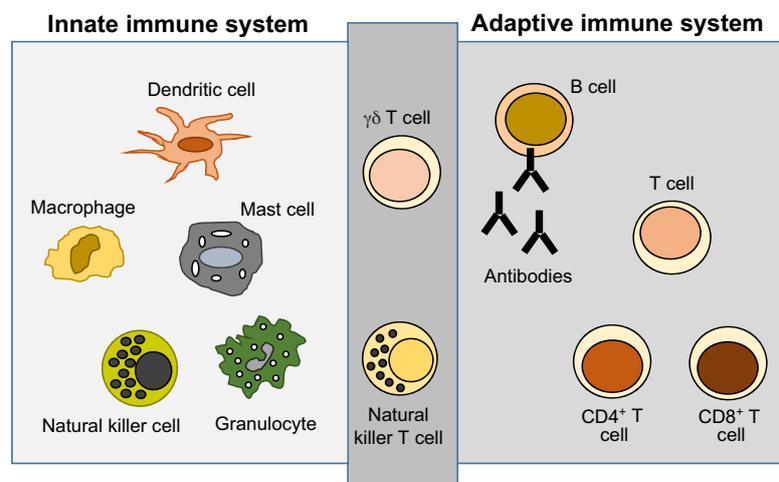


Figure 1: Représentation des cellules du système immunitaire ²

1.1.3 La réponse immunitaire innée

L'immunité innée constitue la première ligne de défense contre les agents pathogènes (bactéries, champignons, parasites et virus). Elle se met en place de manière rapide et

spontanée, sans nécessité de contact préalable avec le pathogène. Elle est transitoire, non spécifique et n'engendre pas de « mémoire immunologique ». La réponse immunitaire innée englobe des barrières physiques (épithéliums digestif, bronchique et urogénital), une composante cellulaire (cellules Natural killer, neutrophiles et macrophages), ainsi qu'une composante humorale (le complément) ¹.

Le pathogène est reconnu par l'immunité via des motifs moléculaires spécifiques. Par exemple, la reconnaissance des bactéries implique le formylméthionine à l'extrémité N-terminale, puisque ce type de modification post-traductionnelle est absent chez les eucaryotes. D'autres cibles incluent les peptidoglycanes présents au niveau des flagelles et des parois bactériennes, l'acide teichoïque sur les bactéries Gram positives et les LPS (lipopolysaccharides) sur les bactéries Gram négatives. Les antigènes fongiques reconnus par l'organisme sont la chitine, le glycane et le zymosane ³.

1.1.4 Lien entre immunité innée et adaptative

L'immunité innée est insuffisante pour nous protéger totalement des agents pathogènes. Une seconde réponse immunitaire spécifique d'un antigène se met alors en place : l'immunité adaptative.

Lorsqu'un pathogène envahit notre corps, l'immunité innée active et régule les réponses de l'immunité adaptative par le biais des CPA (cellules présentatrices de l'antigène). Les CPA présentent l'antigène étranger via le CMH-II (complexe majeur d'histocompatibilité de classe II) aux lymphocytes pour les activer (figure 2).

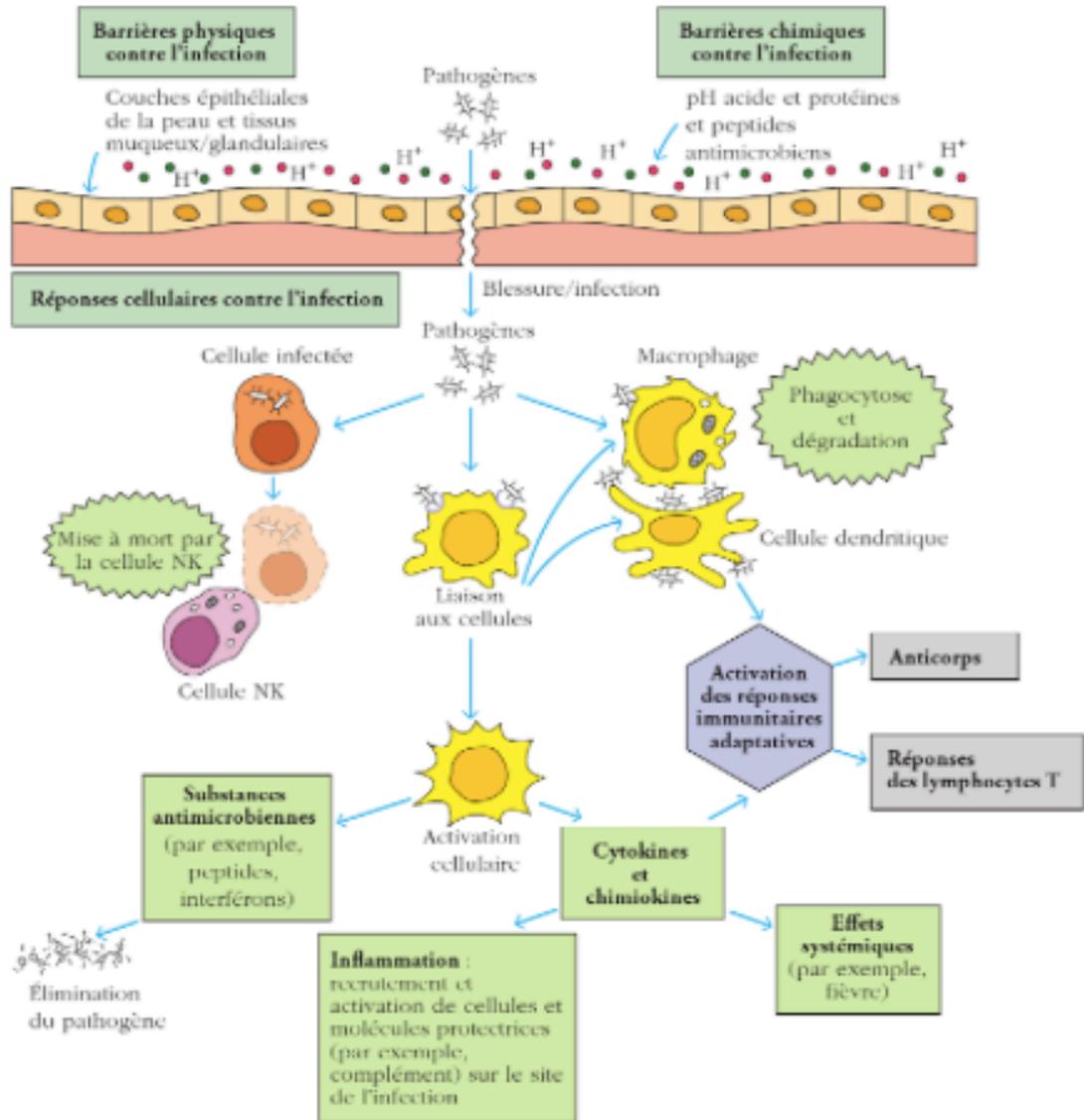


Figure 2 : Schéma de l'activation du système immunitaire après une infection ¹

1.1.4.1 Cellule dendritique

La cellule dendritique est la principale CPA de l'organisme. Il s'agit d'une cellule du système immunitaire, faisant le lien entre immunité innée et acquise. Ces cellules présentent de nombreuses dendrites augmentant leur surface de contact avec les autres cellules immunitaires, ce qui permet de faciliter leurs fonctions.

Les principales fonctions des cellules dendritiques sont la phagocytose, la présentation d'antigènes et la production de cytokines. Les cellules dendritiques immatures phagocytent

les pathogènes et clivent les antigènes en petits peptides. Les antigènes sont ensuite présentés via les CMH de classe I ou II à leur surface¹⁴. Une fois matures, les cellules dendritiques migrent dans la rate et les ganglions lymphatiques grâce à l'expression de CCR7 (récepteurs aux chimiokines 7). Elles ont ainsi l'opportunité d'activer les lymphocytes naïfs par le biais des CMH^{1,4}. Cependant, la seule présentation du CMH au lymphocyte ne suffit pas à son activation. La cellule dendritique fournit également des signaux de co-stimulation¹. Nous étudierons plus en détail l'activation des lymphocyte T, 1.2.1.3 Activation des lymphocyte T.

Il est à noter qu'au sein des ganglions lymphatiques, les cellules dendritiques folliculaires interagissent principalement avec les LB (lymphocytes B), alors que les cellules dendritiques de la zone para-corticale interagissent plutôt avec les LT (lymphocytes T)⁴.

1.1.5 La réponse immunitaire adaptative

L'immunité adaptative est le second pilier de la réponse immunitaire. Elle repose sur l'action coordonnée des CPA, des LB et des LT. Elle est spécifique d'un antigène et assure la mémoire immunologique.

Il existe deux familles de lymphocytes issus de cellules souches hématopoïétiques. Ils diffèrent par leur lieu de maturation : la moelle osseuse pour le lymphocyte B et le thymus pour le lymphocyte T. Les LT assurent l'immunité à médiation cellulaire et jouent un rôle essentiel dans la régulation des réponses immunitaires. Les LB synthétisent les anticorps et jouent un rôle dans l'immunité à médiation humorale.

Chaque population de lymphocytes possède une fonction précise qui sera détaillée dans le prochain paragraphe.

1.2 Les acteurs de l'immunité adaptative

1.2.1 Le lymphocyte T

Les Lymphocytes T sont issus de la lignée hématopoïétique lymphoïde mais leur maturation est thymo-dépendante, d'où leur nom ⁴. Un LT se caractérise par l'expression à sa surface du TCR (récepteur des cellules T) spécifique d'un antigène. Ils sont ainsi capables de reconnaître une variété infinie d'antigènes.

Il existe trois populations majeures de LT : les LT CD8, les LT CD4 et les cellules NK T (Natural killer T) ¹. Les cellules NK T possède également un TCR mais elles ne sont pas spécifiques d'un antigène

1.2.1.1 Ontogénèse des lymphocytes thymo-dépendants

Chez l'adulte, les cellules souches hématopoïétiques sont à l'origine des cellules sanguines. Elles se divisent pour donner des cellules souches pluripotentes, puis multipotentes. En fonction de leur différenciation, elles deviendront précurseurs des lignées myéloïde ou bien lymphoïde. Actuellement, tous les mécanismes de différenciation ne sont que partiellement connus ⁵.

Une fois atteint le stade de précurseurs lymphoïdes, certaines cellules migrent du stroma hématopoïétique au thymus via le sang. Une fois dans le thymus, les précurseurs se différencient en cellules pro T, puis en pré T (Figure 3). Les cellules pré T expriment un pré-TCR, c'est à dire sans l'expression des co-récepteurs CD4 et CD8. Elles sont dites « doubles négatifs » (CD4-/CD8-). Seuls les doubles négatifs poursuivent la maturation pour devenir « doubles positifs » (CD4+ / CD8+); l'expression du TCR est alors complète ⁴.

Enfin, les cellules doubles positives appelées « thymocytes » sont sélectionnées en fonction de l'affinité pour les antigènes : ceux du soi d'abord, puis ceux du non-soi ⁴.

- La sélection positive : les thymocytes capables de se lier à un CMH reçoivent un signal de survie dit « positif » ; les autres meurent par apoptose. Les survivants sélectionnés se déplacent vers la médulla du thymus. Ces thymocytes se scindent en deux populations, en fonction de la présence de CD4 ou CD8 à leur surface.

- La sélection négative : dans la médulla, les thymocytes CD4⁺ ou CD8⁺ sont confrontés aux antigènes du soi. Les thymocytes dont le TCR interagit avec les auto-antigènes meurent par apoptose à la suite d'une hyperactivation. Cette étape évite la survenue de réactions auto-immunes. Une fois sélectionnés, les lymphocytes CD4⁺ ou CD8⁺ dits naïfs sortent du thymus et rejoignent la circulation sanguine. Cette étape est appelée « tolérance centrale ». Il existe donc deux populations de lymphocyte avec des fonctions différentes, les lymphocytes CD4 et CD8.

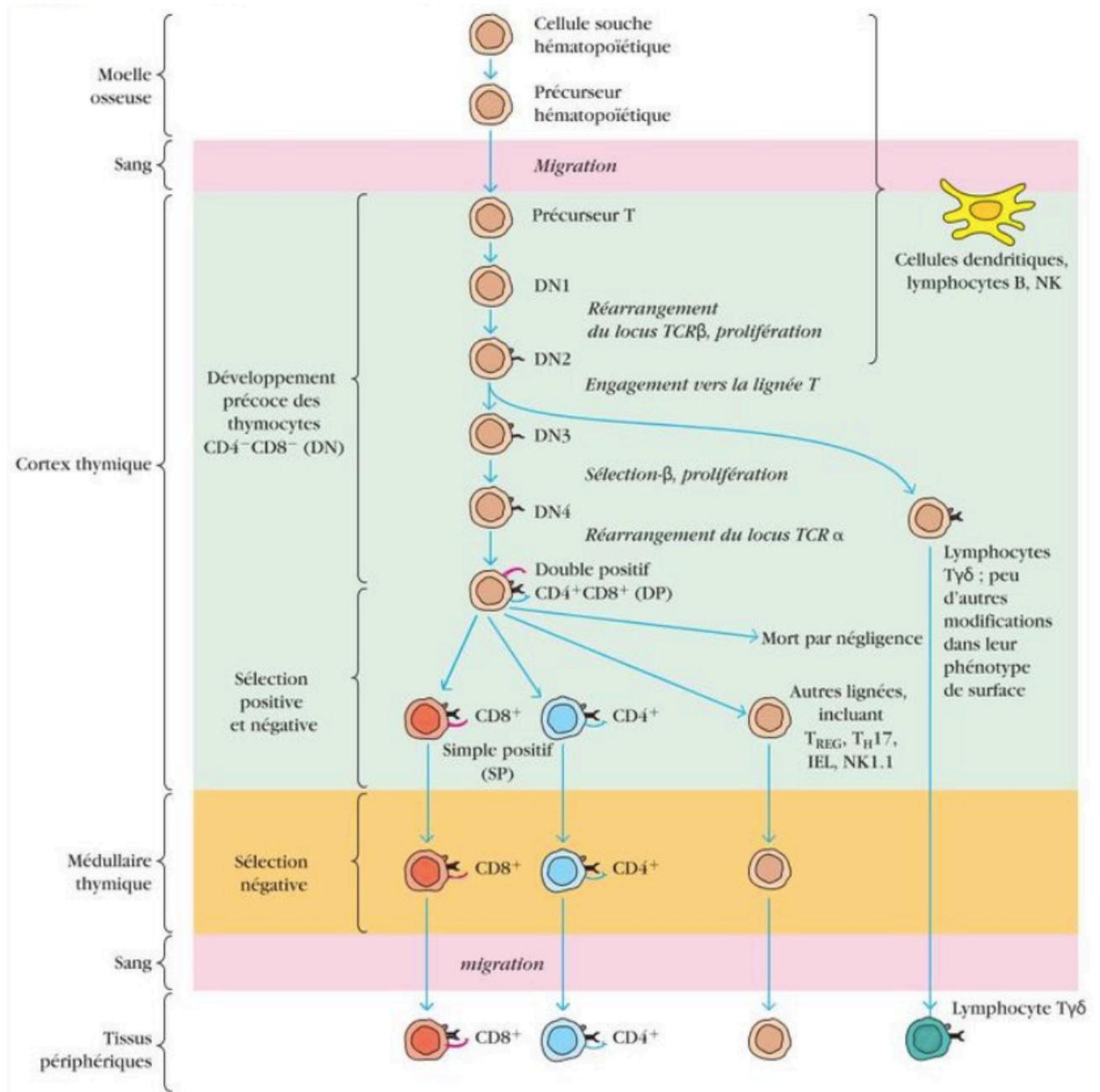


Figure 3 : Développement des lymphocytes T¹

1.2.1.2 Récepteur des cellules T

Le TCR confère aux lymphocytes T leur fonction unique de reconnaissance de l'antigène. Le TCR est une construction complexe constituée de plusieurs chaînes protéiques issues de la superfamille des immunoglobulines (Figure 4) ¹.

La partie extracellulaire est un assemblage de deux chaînes différentes reliées par un pont disulfure. La structure forme un seul site de liaison à l'antigène ¹. Les chaînes alpha-beta ($\alpha\beta$) ou delta-gamma ($\gamma\delta$) s'associent respectivement en hétérodimères pour constituer un TCR $\alpha\beta$ ou un TCR $\gamma\delta$. Bien qu'ayant des structures très proches, ces deux types de TCR présentent des spécificités différentes dues à des variations de conformation du site de liaison à l'antigène, notamment l'angle d'ouverture ⁴. Les LT à TCR $\gamma\delta$ pourraient reconnaître des antigènes restreints, mais la nature et le mécanisme de reconnaissance restent à définir. Chaque chaîne possède une région constante et une région variable. La région variable assure la spécificité du TCR et présente trois domaines hypervariables, à l'exception de la chaîne β qui en possède quatre ⁴.

La partie transmembranaire et intracellulaire se compose du complexe CD3. Le CD3 est formé de deux hétérodimères de chaînes δ,ϵ et γ,ϵ et d'un homodimère de chaînes ζ . La reconnaissance de l'antigène par la partie extracellulaire entraîne un changement de conformation permettant la phosphorylation du motif ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) du complexe CD3. La structure du CD3 assure la transduction du signal, et donc l'activation des LT ^{1,4}.

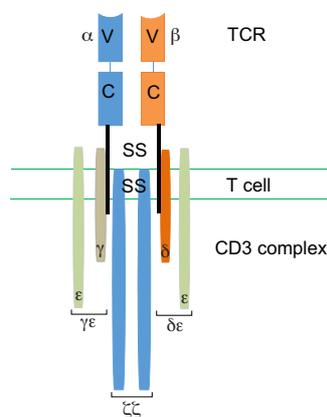


Figure 4 : Structure d'un TCR $\alpha\beta$ ²

Les lymphocytes LT $\alpha\beta$ représentent 90 à 95% des LT CD8. Ils ne reconnaissent que des antigènes peptidiques ⁴.

Les LT $\gamma\delta$ sont essentiellement intra-épithéliaux. Ils reconnaissent des antigènes lipidiques, glycolipidiques ou phospholipidiques par le CD1. La variabilité des LT $\gamma\delta$ est plus faible que celle des LT $\alpha\beta$ ⁴.

1.2.1.3 Activation des lymphocytes T

Lors d'une infection, les CPA phagocytent les pathogènes et présente les antigènes grâce au CMH-II. Ors les LT ont besoin d'une CPA pour s'activer. Ainsi le CPA migre vers le ganglion et est reconnu par un LT naïf. La liaison du couple CPA/LT naïf est appelée synapse immunitaire. Les récepteurs ICAM-I (InterCellular Adhesion Molecule 1) des CPA et LFA-1 des LT stabilisent l'ensemble ⁴. La présentation de l'antigène par la CPA au lymphocyte provoque un changement de conformation du TCR. La tyrosine kinase Lck (Lymphocyte-specific protein) peut alors phosphoryler les motifs ITAM de la chaîne ζ du CD3. La chaîne ζ phosphorylée recrute la protéine ZAP-70 (Zeta associated protein). Le ZAP-70 recrute à son tour d'autres protéines entraînant une cascade de réactions aboutissant à la transduction du signal d'activation ⁴.

Le LT activé inhibe ses protéines apoptotiques pour proliférer, puis il circule jusqu'aux tissus cibles via l'expression d'intégrines, de sélectines et de récepteurs aux chimiokines dont VLA-4 (Very late antigen 1), CXCR3 (C-X-C chemokine receptor type 3) et LFA-1 ⁴.

1.2.1.4 Co-stimulation des lymphocytes T

La co-stimulation, également appelée « second signal », a un rôle crucial dans l'activation des LT. Sans la co-stimulation, le signal d'activation est insuffisant et le lymphocyte entre dans un état d'anergie, puis meurt par apoptose. La co-stimulation intervient parallèlement à la présentation des antigènes. Les CPA expriment de nombreux ligands co-stimulateurs se liant à leurs homologues présents à la surface des LT (Figure 5). Selon le couple ligand-récepteur, l'activation du lymphocyte sera amplifiée ou inhibée ^{1,4}.

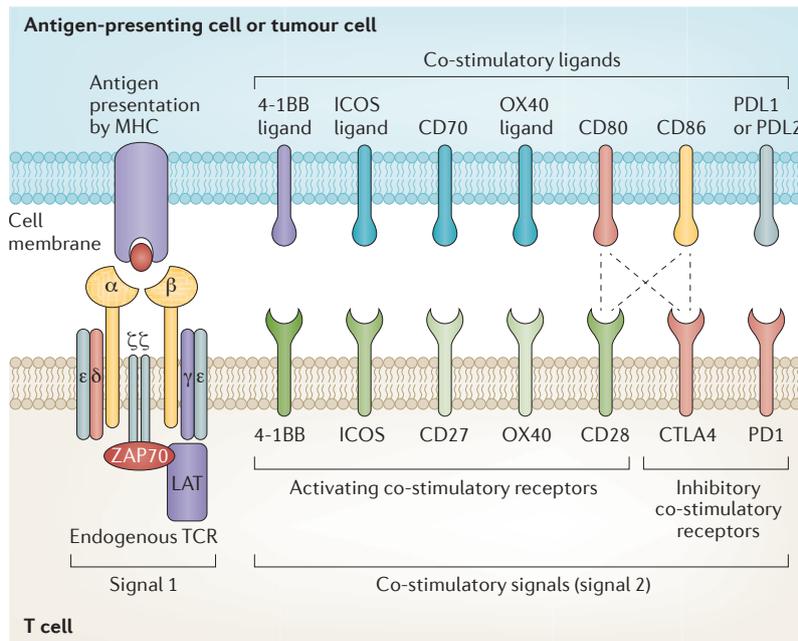


Figure 5 : Les co-récepteurs d'une synapse immunologique ⁶

1.2.1.5 Le troisième signal

L'activation des LT ne dépend pas uniquement de la présentation de l'antigène et des récepteurs de co-stimulation, il existe un troisième signal. Ce signal est délivré par des cytokines et des signaux de danger présents dans l'environnement immédiat des lymphocytes. Il peut favoriser ou inhiber l'expansion des lymphocytes et leur différenciation ^{1,4}.

1.2.1.6 Phénomène de tolérance périphérique

Pour éviter la genèse de lymphocytes auto-réactifs, c'est à dire dirigés contre le soi, l'organisme induit une tolérance centrale et périphérique. Cette veille est assurée par les CPA en périphérie.

Lorsqu'un CPA présente un antigène du soi, les interactions avec les récepteurs de co-stimulation n'ont pas lieu : la transduction du signal est faible ⁴. Cela conduit les lymphocytes à entrer dans un état d'anergie fonctionnelle ^{2,7}. Il est important de noter que l'induction d'une tolérance centrale ou périphérique peut conduire les lymphocytes T vers un phénotype régulateur.

Chacun de ces mécanismes tolérogènes peut être détourné par les cellules tumorales pour

échapper au système immunitaire (voir la partie sur la phase d'échappement tumoral).

1.2.1.7 Les sous populations de lymphocytes T

Les lymphocytes constituent des populations hétérogènes d'un point de vue fonctionnel¹. La présence de récepteur CD4 ou CD8 à leurs surfaces détermine leurs actions. Les LT CD4 sont dits auxiliaires ou *helpers*. Ils modulent la réponse immunitaire au niveau des organes lymphoïdes secondaires et du site d'infection par la production de cytokines. Les LT CD8, après la rencontre avec l'antigène via le CMH-I (complexe majeur d'histocompatibilité de classe I), ont une action cytotoxique. Ces LTC (lymphocytes T cytotoxiques) quittent les ganglions et circulent vers le site d'infection pour détruire les cellules cibles¹. Les lymphocytes auxiliaires et cytotoxiques peuvent se différencier en lymphocytes T mémoire, assurant une réponse plus rapide lors d'une deuxième agression.

1.2.1.8 Lymphocyte T CD8

La fonction principale des LTC est cytolytique contre les pathogènes intracellulaires, mais également contre les cellules tumorales^{1,4}. Les LT CD8 sont deux fois moins nombreux que les LT CD4.

Le CMH-I des CPA interagit avec le TCR et des co-récepteurs dont le CD8 pour aboutir à l'activation du LTC. Puis la cytolysse des cellules cibles passe par^{1,4}:

- La liaison entre les récepteurs de mort cellulaire Fas (Apoptosis Stimulating Fragment) exprimés sur les cellules cibles et leur ligand (FasL Apoptosis Stimulating Fragment Ligand) exprimé en surface des LTC, induisant l'apoptose.
- La libération de granules cytoplasmiques contenant des protéines lytiques, granzymes et perforines.

1.2.1.9 Lymphocyte T CD4

L'action indirecte des LT CD4 est prépondérante, bien qu'ils expriment à leur surface des ligands des récepteurs de mort FasL et synthétisent des perforines et granzymes à l'image des

LT CD8, ce qui leur confère une action cytolytique ¹.

Il existe plusieurs sous-populations de LTh (lymphocytes T helpers) avec différents rôles. Les cytokines dans l'environnement proche (signal 3) détermineront le phénotype de ces sous-populations (Figure 6). Ce phénomène est appelé la « polarisation de la réponse ». Chaque sous-population de LTh se caractérise par un ensemble distinct de cytokines polarisantes, de gènes régulateurs et de cytokines sécrétées effectrices ^{1,4}.

La nature des cytokines produites dépend : de la cellule d'origine (cellule dendritique, macrophage, LB...), de l'état de maturation et d'activation du LTh, de la nature du pathogène, du médiateur de l'inflammation qu'elle rencontre et de l'environnement dans lequel elle rencontre le pathogène ^{1,4}.

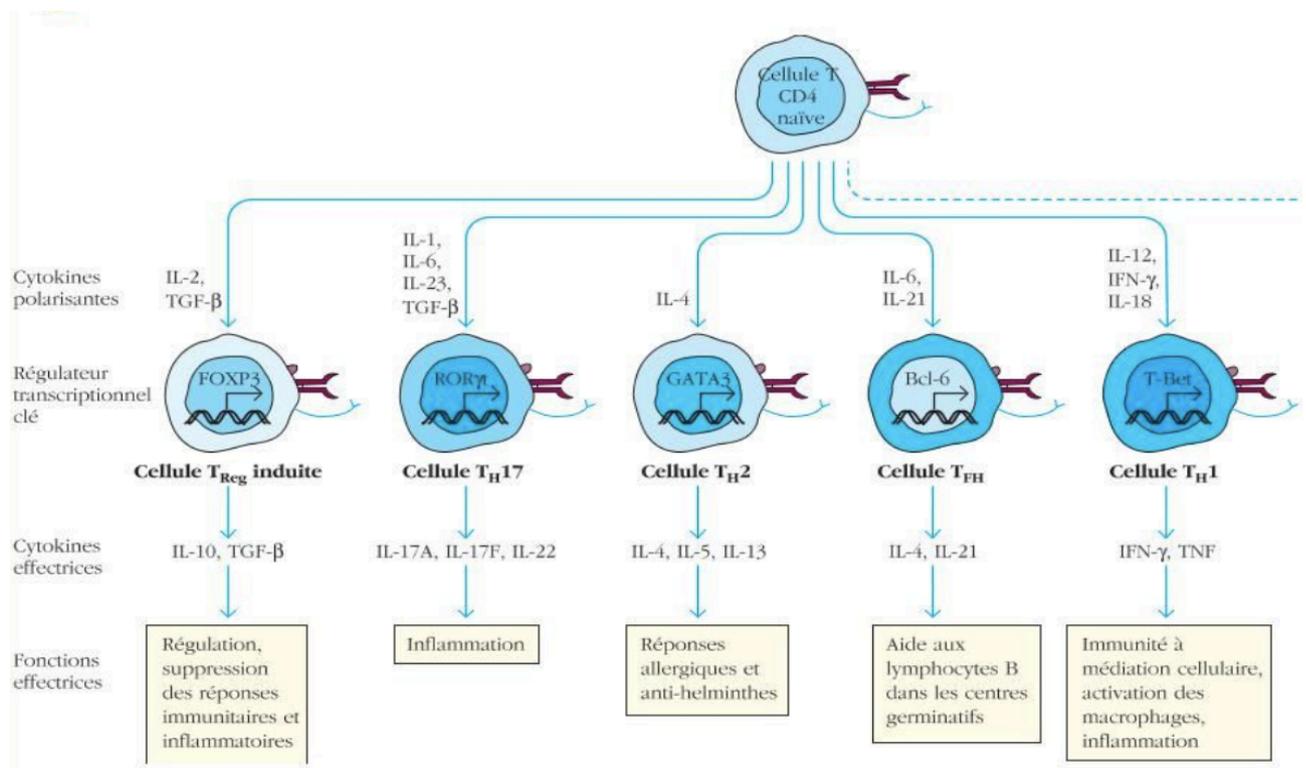


Figure 6 : Différenciation des sous-populations auxiliaires ¹

Nous nous concentrerons sur les sous-populations Th₁, Th₂, Th₁₇ et Treg (T régulateur).

1.2.1.9.1 Lymphocyte Th₁

Les cytokines induisant la différenciation de LT naïfs en LTh₁ sont l'IL-12, l'IL-18 et l'IFN- γ (interféron gamma). Les cellules dendritiques sécrètent l'IL-12 et l'IL-18 soit après leur activation, soit par stimulation de l'IFN- γ . Le LTh₁ sécrète principalement de l'IFN- γ et du TNF (Tumor necrosis factor) ⁴. L'IFN- γ aussi sécrété par les cellules NK, entraîne la production des cytokines polarisantes, créant une boucle d'induction.

L'IFN- γ stimule la phagocytose des macrophages et l'expression du CMH-II. Il induit également la commutation des LB vers la sécrétion d'Ig G (immunoglobuline) et favorise la différenciation des LT CD8.

En somme, le LTh₁ contribue à l'immunité à médiation cellulaire et a une action anti-tumorale¹.

1.2.1.9.2 Lymphocyte Th₂

Au site inflammatoire, les mastocytes, les basophiles, les cellules NK, LB, LThf (lymphocytes T helpers folliculaires) et même les LTh₂ produisent de l'IL-4 au niveau des ganglions. Cette production aboutit à la formation des LTh₂. Le LTh₂ sécrète IL-4, IL-5 et IL-13 afin de stimuler l'élimination des infections extracellulaires parasitaires en induisant la sécrétion d'Ig E par les LB et en activant les éosinophiles.

Cependant, une forte concentration d'IL-4 provoque une sur-expression de protéines anti-apoptotiques (FLIP et Bcl-xL) favorisant la survie des cellules tumorales ⁸.

Les profils Th₁ et Th₂ étant opposés, la balance Th₁/Th₂ est un élément primordial dans l'orientation de la réponse immunitaire vis à vis des tumeurs. Il convient donc de chercher à favoriser un phénotype Th₁ plutôt que Th₂ dans la lutte anti-tumorale, tout en gardant à l'esprit qu'une présence importante de LTh₁ est susceptible de produire des phénomènes auto-immuns iatrogènes.

1.2.1.9.3 Lymphocyte Th₁₇

Les LTh₁₇ sont générés en présence d'IL-6, IL-1 et de TGF- β (Transforming growth factor beta). Ils sécrètent de l'IL-17A et IL-17F, d'où leur nom, ainsi que de l'IL-22. Ils luttent

contre des infections bactériennes ou fongiques. Ils sont également impliqués dans les maladies auto-immunes et les phénomènes inflammatoires ⁴.

Les LTh₁₇ sont très plastiques, ce qui leur permet de s'adapter à différents environnements. Ils ont la capacité de se différencier à nouveau en LTh₁, LTh₂ ou LTreg en fonction des cytokines présentes ⁹ respectivement INF- γ , IL-4 et IL-2.

1.2.1.9.4 Lymphocytes T régulateurs

Ils sont subdivisés en deux populations en fonction de leur origine périphérique ou centrale : les LTreg centraux sont produits dans le thymus lors de la sélection clonale, à partir des lymphocytes T CD4 auto-réactifs échappant à l'apoptose ⁴. Les LTreg périphériques se différencient à l'aide des cytokines TGF- β , IL-10 et VEGF (Vascular endothelial growth factor).

Comme son nom l'indique, cette sous-population a un rôle de régulateur de la réponse adaptative immunitaire. Le LTreg inhibe l'activité des LT auto-immuns et les fonctions effectrices des lymphocytes T CD4 et CD8, NK et NK T ¹⁰. L'action immunosuppressive des LTreg passe par différents mécanismes ^{1,4} dont :

- La cytotoxicité : Le LTreg est capable d'avoir une activité cytolytique directe sur les lymphocytes T effecteurs et sur les CPA. Cette activité passe par les granules de perforines et de granzymes,
- La consommation excessive d'IL-2 : le LTreg exprime des récepteurs d'IL-2 d'affinités différentes. Le CD25, le CD122 et le CD132 ont des affinités respectivement faible, moyenne et très forte. Leur affinité est corrélée aux différentes chaînes qui les constituent, CD25 possède une chaîne α , CD122 possède une chaîne α , β et CD132 avec une chaîne α , β et γ . Ces récepteurs lui permettent de capter une grande partie de l'IL-2.
- La sécrétion de cytokines immuno-suppressives : la sécrétion TGF- β et l'IL-10 diminue l'expression des CMH et des molécules de co-stimulation par les cellules dendritiques, empêche leur maturation, diminue l'activité anti-tumorale des

macrophages et des cellules NK. Pour finir, elle inhibe la fonction des lymphocytes LT CD8. De plus, le TGF- β permet une augmentation du nombre de LTreg, participant à la boucle de rétrocontrôle positif.

- La co-stimulation négative : l'expression de récepteurs de co-stimulation inhibiteurs tels que CTLA4 et PD1 (Programmed death receptor 1)⁴, exerce une tolérance périphérique passant par l'anergie des lymphocytes effecteurs ou leur conversion en LTreg⁴.

Ainsi, le LTreg est un pion majeur dans l'action du système immunitaire.

1.2.1.10 Les lymphocytes T mémoires

Les LT mémoires assurent la mémoire immunologique à long terme. Ils sont caractérisés par une longue durée de vie et une importante capacité de prolifération lors de rencontres secondaires avec les antigènes^{1,4}.

Les lymphocytes naïfs, après activation, se différencient majoritairement (environ 90 % d'entre eux) en cellules effectrices, et seulement une petite part en LT mémoires. Plusieurs types de lymphocytes T mémoires existent, chaque type exprimant un profil d'expression génique particulier. Nous distinguons deux populations : les LT_{MC} (lymphocytes T mémoires centraux) et les LT_{EM} (lymphocytes T effecteurs mémoires) sur la base de leur localisation et de leur fonction⁴.

Les LT_{MC} migrent vers les organes lymphoïdes secondaires et y résident. Ils se caractérisent par une durée de vie plus longue et une prolifération plus importante que les LT_{EM}. Les LT_{EM} circulent vers les organes lymphoïdes secondaire ou tertiaires. Lors d'une réinfection, leur phénotype d'effecteur permet une réponse immédiate et spécifique¹.

Il est à noter que les cellules mémoires sont moins sensibles que les cellules effectrices aux environnements tolérogènes mis en place par les tumeurs¹¹.

1.2.2 Lymphocytes B

Le Lymphocyte B est plus généralement associé au bras armé de l'immunité adaptative par sa

réponse humorale contre les antigènes. Leur lignée est caractérisée par la présence de BCR (récepteurs des cellules B) à leur surface et la sécrétion d'immunoglobulines appelées « anticorps ». Les immunoglobulines sont subdivisées en isotype G, A, M, E, D. Chaque cellule possède un BCR avec sa propre affinité pour un antigène. Chaque LB exprime plusieurs centaines de milliers d'exemplaires de BCR de même spécificité ^{1,4}.

1.2.2.1 Maturation des Lymphocytes B

Contrairement au LT, la maturation de la lignée lymphoïde B a lieu dans la moelle osseuse. Les progéniteurs lymphoïdes communs se différencient en cellules pro-B sous l'influence de l'IL-7, puis en cellules pré-B exprimant des pré-BCR, et enfin en cellules B immatures exprimant des IgM. Les LB immatures quittent alors la moelle osseuse pour terminer leur maturation dans lymphoïde secondaire ¹². Les antigènes du soi sont présentés aux LB immatures afin de réaliser une sélection négative. Les LB immatures auto-réactifs ont la possibilité de s'auto-corriger en réarrangeant leurs gènes VDJ afin de produire un autre BCR non auto-réactif ^{4,12}. Ceux qui échouent sont éliminés par apoptose. Puis, les LB sélectionnés reçoivent un signal de survie et se différencient en LB matures après avoir passé avec succès la sélection positive ¹².

Les lymphocytes B matures migrent alors dans les organes lymphoïdes secondaires, principalement dans la partie folliculaire des ganglions, sous l'influence de chimiokines reconnues par leurs récepteurs CXCR5 ^{4,12}.

1.2.2.2 Récepteurs des cellules B

L'expression des BCR est contrôlée par une recombinaison aléatoire des gènes d'immunoglobulines dit VDJ. Suite à l'exclusion allélique, le LB synthétise un seul type de BCR associé à un type d'Ig soluble ^{1,4}.

Le BCR est une immunoglobuline membranaire constituée de deux chaînes lourdes et deux chaînes légères ⁴. La partie C-terminal du BCR permet l'ancrage dans la membrane ^{4,12}.

Les BCR sont capables de reconnaître des antigènes divers, comme des protéines, des glucides ou encore des lipides ¹². La transduction du signal est assurée par l'hétérodimère Ig α /Ig β qui est lié de façon non covalente au BCR. Après reconnaissance de l'antigène par le

BCR, la transduction du signal se poursuit via des motifs ITAM d'Ig α /Ig β , contenant des tyrosines et faisant intervenir une cascade de réactions passant par des phosphorylations, de façon analogue au TCR^{4,12}.

1.2.2.3 L'activation thymo-dépendante ou indépendante des lymphocytes B

La réponse lymphocytaire B s'active par deux processus. Le premier type nécessite la participation des LT CD4 ; c'est la réponse thymodépendante^{4,12}. Après reconnaissance de l'antigène par le BCR, l'ensemble BCR-antigène est endocyté, dégradé et présenté en peptides exogènes par les CMH-II. Le LB est assimilé aux CPA⁴. Ensuite, ce nouveau LB interagit avec un LTh₂ via le CMH-II et des co-récepteurs dont CD40/CD40L. L'activation du LB engendre la sécrétion d'immunoglobuline^{4,12}.

Le deuxième type de réponse ne nécessite pas l'interaction avec des LT, elle est dite thymo-indépendante. Cette dernière est dirigée vers des Ag (antigènes) principalement multivalents ou fortement polymérisés. Il existe deux types d'activations :

- L'activation thymo-indépendante de type 1 passe par la reconnaissance des motifs associés aux pathogènes via le PRR (pattern recognition receptor). Cela induit une stimulation polyclonale des lymphocytes B^{4,12}.
- L'activation de type 2 passe par les BCR reconnaissant des motifs sucrés répétés, notamment les LPS des grams négatifs. Elle induit donc une stimulation monoclonale, principalement de type Ig M^{4,12}.

1.2.2.4 Fonction des Lymphocytes B

La fonction principale d'un LB est de sécréter des anticorps capables de se lier à toute molécule ou pathogène constituant une menace. Les anticorps G, A, M et E ont chacun un rôle et une localisation différente. Après avoir reconnu un antigène, les lymphocytes B activés subissent la commutation isotypique, leur permettant de passer de l'expression d'Ig D ou Ig M membranaires à d'autres isotypes solubles. Ils se transforment en plasmocytes et perdent l'expression des immunoglobulines membranaires. Ils produisent des immunoglobulines solubles, mais ne se divisent pas et ont, pour la plupart, une durée de vie courte^{4,12}.

Les plasmocytes produisent des milliers d'immunoglobulines par seconde. Ces plasmocytes sont de même spécificité que leur ancien BCR. Les immunoglobulines sont ensuite drainées dans la circulation sanguine.

Les immunoglobulines ont trois rôles ^{4,12}:

- Elles neutralisent la cible, l'empêchant d'accomplir une action (par exemple le blocage d'une toxine),
- Elles permettent de déclencher l'activation du système du complément. L'activation du complément produit le fragment protéique C3b qui se fixe aux cellules cibles dont les LB. Il sert donc d'aide pour les réponses humorales,
- Elles permettent d'opsoniser les cibles, facilitant la phagocytose des cellules immunitaires (NK, macrophages).

1.3 Le cancer : la maladie du siècle

Le cancer est une des principales causes de décès dans le monde, et le nombre de cas ne cesse d'augmenter ¹³. Selon le rapport mondial sur le cancer 2014, l'incidence du cancer a atteint 14 millions de cas en 2012. Ce chiffre devrait atteindre 22 millions par an au cours des deux prochaines décennies. Parallèlement, les décès dus au cancer devraient augmenter de 8,2 à 13 millions par an. La plupart des cancers peuvent être prévenus ou guéris, s'ils sont détectés à un stade précoce et traités rapidement. Par le manque de marqueurs biologiques pour le dépistage précoce, la plupart des patients présentent une maladie à un stade avancé, ce qui limite les chances de réussite des traitements ¹⁴.

1.3.1 Caractéristique d'une cellule cancéreuse

Une cellule, au court de sa vie, se divise, acquière sa fonction et meurt par une mort programmée appelée « apoptose ». L'homéostasie des tissus est ainsi maintenue par les processus de prolifération et de mort cellulaire. Dans certains cas, une cellule ne répond plus au contrôle des signaux de l'organisme. Elle se développe de manière anarchique. Si cette capacité est transmise à la descendance, les clones deviendront immortels ; ces cellules forment alors une tumeur. D'un point de vue immunologique, les cellules cancéreuses peuvent être considérées comme des cellules du soi modifiées qui ont échappé aux mécanismes classiques de la croissance cellulaire.

Une cellule cancéreuse est caractérisée par ¹⁵ :

- Son indépendance vis-à-vis des signaux qui la régulent (favorisent ou freinent) habituellement sa croissance et sa division,
- Sa capacité à échapper au processus de mort cellulaire programmée,
- Sa capacité à se diviser indéfiniment.

1.3.2 Tumeur bénigne et tumeur maligne

Les clones cellulaires qui peuvent proliférer de façon incontrôlée produisent des tumeurs. Une tumeur qui croît de manière définie dans l'espace et le temps est une tumeur bénigne. Elle n'envahira pas le tissu sain avoisinant. En revanche, une tumeur qui croît de manière continue et totalement anarchique dans différents tissus via le système sanguin ou lymphatique est une tumeur maligne ou cancer. Les métastases sont la colonisation des cellules cancéreuses dans une autre partie du corps.

Les tumeurs malignes sont classées en fonction de leur origine embryonnaire tissulaire. Le carcinome est la tumeur la plus courante soit quatre-vingts pourcents. Il provient des tissus endodermiques et ectodermiques, comme la peau ou les différents épithéliums en bordure de glandes exocrines. Neuf pourcents sont issus des cellules hématopoïétiques, dont les leucémies, les lymphomes et les myélomes ¹.

1.3.3 La cancérogenèse

La transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse est un processus en plusieurs étapes qui implique une série d'événements (chimiques, physiques, génétiques et environnementaux). Ces événements aboutissent à une modification du code génétique de la cellule saine. La succession d'altération du génome engendre une cellule précancéreuse voir cancéreuse lorsque les altérations sont irrémédiables. Les gènes impliqués codent pour :

- Des protéines qui stimulent ou répriment la prolifération : il s'agit des oncogènes,
- Des protéines qui répriment la prolifération : les anti-oncogènes,
- Des protéines impliquées dans le cycle de vie cellulaire et l'apoptose.

La cancérogenèse se réalise en plusieurs étapes (Figure 7) : l'initiation dans un premier temps, la promotion cancéreuse dans un second, et enfin la prolifération. La promotion est un processus réversible, tandis que la prolifération est irréversible ¹⁵.

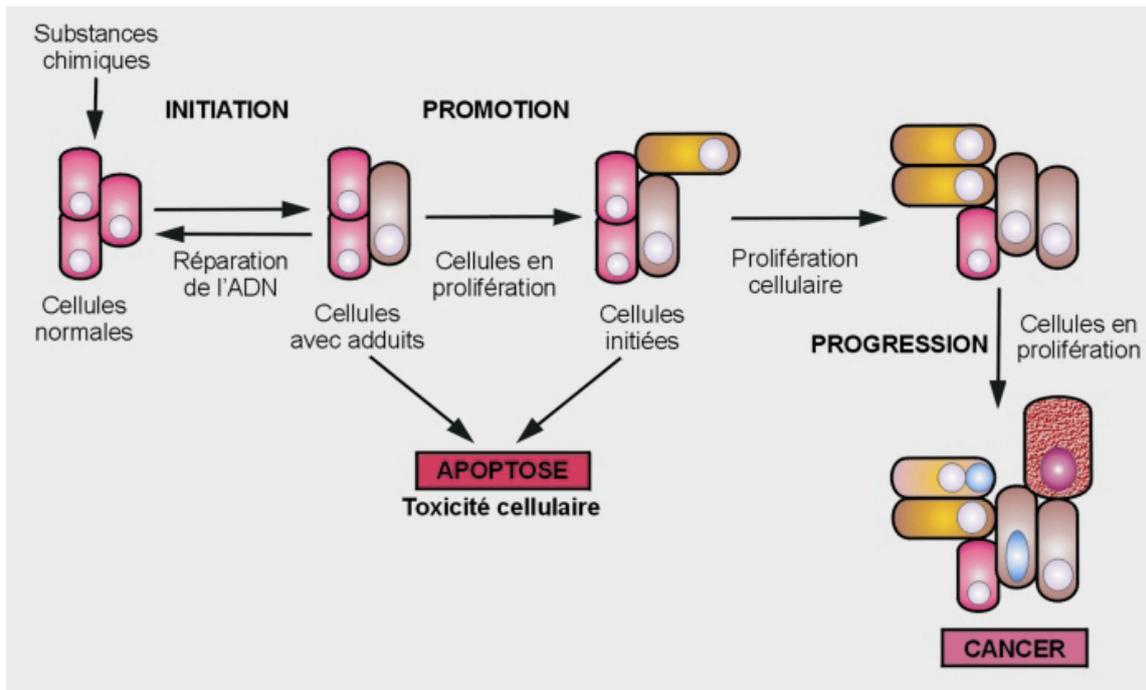


Figure 7 : Schéma du processus de cancerogénèse ¹⁶

1.3.3.1 Le processus d'initiation tumoral

La phase d'initiation passe par une mutation génétique d'une cellule saine. Les altérations génétiques peuvent être induites par des agents chimiques (comme l'amiante), des agents physiques, des radiations ionisantes ou des pathogènes viraux (virus de l'hépatite C) ainsi que par des erreurs lors de la mitose ¹. De même, il se peut que l'inflammation chronique favorise l'expansion de cellules ¹⁷.

Cependant, une seule mutation ne suffit pas pour enclencher le processus suivant ¹⁵. Le risque est plus important si la mutation a lieu dans une cellule peu différenciée se divisant rapidement, que si la mutation se produit dans une cellule différenciée à division et durée de vie plus limitées ¹⁷.

1.3.3.2 Le processus de promotion tumoral

Au cours de la promotion, la cellule initiée acquiert par mutations successives une augmentation de la prolifération et une perte de l'apoptose. La rupture de l'homéostasie tissulaire mène à une lésion précancéreuse. Ce processus clef est réversible et modulé par le système immunitaire et les hormones ¹.

1.3.3.3 Le processus de prolifération tumorale

Enfin, l'étape de progression cellulaire conduit à une lésion cancéreuse irréversible. Le cancer s'installe à la suite de divisions cellulaires amenant de nombreuses mutations et la sélection de caractères malins comme la capacité de métastaser ¹.

1.3.4 Mécanisme de défense cellulaire

Au fil de l'évolution, des mécanismes cellulaires de lutte contre la cancérogenèse sont apparus empêchant le développement de futures cellules précancéreuses. Ces mécanismes sont de deux natures : intrinsèque ou extrinsèque aux cellules.

1.3.4.1 Mécanismes intrinsèques

Il s'agit d'une réponse intracellulaire à la suite de lésion de l'ADN (acide désoxyribonucléique). Par exemple, il existe plusieurs systèmes de réparation de l'ADN en fonction du type de lésion. La voie NER (nucleotide excision repair) répare les dimères de thymine formés lors de l'exposition aux radiations ultra-violet ¹. D'autres voies conduisent à l'apoptose des cellules si les lésions son irréparable.

1.3.4.2 Mécanismes extrinsèques

Les mécanismes extrinsèques sont des réponses à des stimuli extracellulaires induisant l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose ¹. Les stimuli sont de différentes natures. Par exemple, la perte de contact entre les cellules épithéliales et la matrice extracellulaire provoque l'apoptose par la voie des caspases ¹¹⁸. L'apoptose peut également passer par l'activation de récepteurs de mort comme le récepteur du TNF présent à la surface cellulaire ¹⁸.

Ces mécanismes intrinsèques et extrinsèques apparaissent comme les toutes premières lignes de défense de l'organisme vis à vis des cellules transformées. Toutefois, si ces mécanismes cellulaires échouent, le système immunitaire aura pour rôle d'éliminer les cellules, comme nous le verrons pour la suite.

1.4 La réponse immunitaire face au cancer

1.4.1 Concepts d'immunogénicité, d'immunosurveillance et d'immunoédition

L'instabilité génique des cellules tumorales se traduit par l'accumulation de mutations, de translocations et de délétions provoquant l'expression de nouveau CMH-I ou surexpression d'autres. Or suite au processus de tolérance, le SI reconnaît le soi du non-soi à l'aide du CMH-I. L'expression de CMH-I atypique est reconnue comme immunogène (du non-soi) par les cellules du SI. Ainsi l'immunogénicité représente la capacité du SI à reconnaître les cellules tumorales comme appartenant au non-soi⁴. Face aux tumeurs, le système immunitaire ne lutte pas à des pathogènes, mais contre des cellules du soi perçues comme étrangères sans être infectées. La lutte anti-tumorale doit donc être efficace face aux multiples types cellulaires.

La mise en place d'une réponse immunitaire est appelée « immunosurveillance »¹. Elle est associée à l'immunogénicité puis à l'élimination des cellules tumorales par le SI. Ce concept a été initialement décrit par Paul Ehrlich et William Coley au début du siècle dernier¹. Dans les années 1960-1970, Burnet et Thomas ont émis l'hypothèse selon laquelle le SI engendre une sélection des cellules tumorales^{19,20}. De plus, une inflammation chronique pourrait contribuer à la dispersion et à la survie des cellules tumorales. Ces nouvelles observations d'une réponse immunitaire pro-tumorale changent profondément le concept d'immunosurveillance^{21,22,23,24}.

Ainsi la théorie de l'immunoédition émergea pour nuancer le rôle du SI dans le cancer^{21,22,23,24}. Dans ce nouveau concept, le système immunitaire applique sur les cellules tumorales une pression sélective constante. Le système immunitaire façonne le profil immunogène des tumeurs alors que, dans un même temps, les cellules tumorales modulent le système immunitaire afin d'y échapper. L'immunogénicité d'une tumeur est donc constamment modifiée. Il en résulte une balance en évolution permanente entre réactions pro-tumorales et anti-tumorales^{22,23,24}. De ce fait, la progression tumorale semble sous le contrôle de trois phases distinctes abordées par le prisme de la théorie des 3E de Schreiber^{4,21} : l'élimination, l'équilibre et l'échappement (Figure 8).

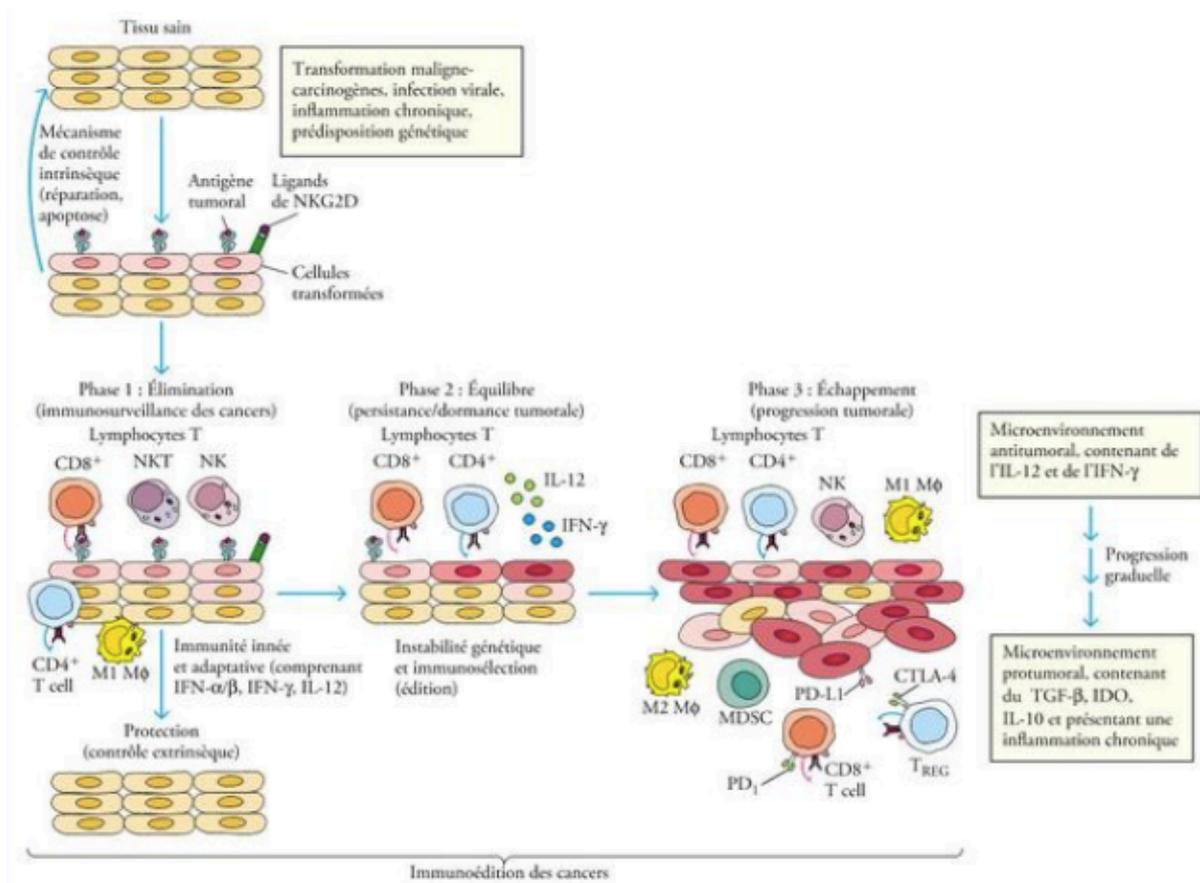


Figure 8 : Schéma des 3 phases de l'immunoédition ¹

L'élimination est une phase de détection et de reconnaissance assimilée à l'immunosurveillance. Elle est suivie par la phase d'équilibre. Cette période de latence se caractérise par un état d'équilibre entre la destruction et la survie d'un petit nombre de cellules tumorales pouvant durer plusieurs décennies. Ce processus est vraisemblablement observable chez l'homme lors d'une greffe d'organes ^{23,25}. L'état d'immunodépression du patient greffé pour éviter le rejet, rompt l'état d'équilibre du donneur. Il s'en suit la progression du cancer chez le receveur. Suite à la pression du SI, chaque nouvelle mutation confère aux cellules filles tumorales une plus haute résistance aux attaques. Cette brèche dans le système immunitaire se produit sans doute lorsque les changements génétiques ont conféré à ces cellules une résistance suffisante pour échapper à la détection et à l'élimination. De plus, l'état de tolérance induit par la tumeur est favorable à son expansion. Ainsi, une tumeur esquive complètement la surveillance et la pression exercées par le système immunitaire pour entrer dans la phase finale : l'échappement. L'échappement résulte d'un processus de sélection darwiennien ^{18,20,21,26}.

1.4.2 La reconnaissance des cellules tumorales : l'immunogénécité

Ce concept permet d'appréhender à la fois la façon dont le SI reconnaît les cellules tumorales et l'échappement des cellules immunitaires à la surveillance. Trois points seront développés : les TAA (antigènes associés à la tumeur), l'établissement d'une barrière physique, le rôle du micro-environnement.

1.4.2.1 Les antigènes associés à la tumeur

Les cellules tumorales expriment, comme les cellules du soi, des antigènes via le CMH-I et participent donc aux mécanismes de tolérance du soi. Les antigènes exprimés à la surface de ces cellules tumorales sont majoritairement communs avec ceux des cellules saines et ne sont donc pas reconnus par le système immunitaire. Les cellules tumorales peuvent présenter une expression aberrante des antigènes du soi, détectée par les défenses immunitaires. Elle peut également arborer des antigènes uniques : ce sont les TAA (antigène associé à la tumeur)⁴. Le premier antigène du cancer humain MAGEA1 (melanoma associated antigen A1) a été identifié en 1991 à partir du mélanome¹⁴. Depuis, 403 peptides antigéniques du cancer ont été recensés¹⁴. Ces TAA permettent au SI de déclencher une réponse.

Une autre notion de l'immunogénécité d'une tumeur est l'antigénécité intrinsèque. Elle est liée au nombre de CMH présents à la surface de la tumeur, de la qualité des épitopes reconnus et de la force de la liaison du CMH aux molécules²⁷.

1.4.2.2 L'établissement d'une barrière physique

La mise en place d'une barrière physique diminue l'immunogénécité en limitant l'accès des cellules tumorales au SI, notamment avec les fibroblastes associés aux tumeurs¹.

1.4.2.3 L'état du micro-environnement tumoral

Le micro-environnement tumoral est un élément majeur de l'immunogénécité. La présence de très nombreux facteurs de croissance, de cellules, de cytokines sont susceptibles de modifier l'interprétation par le SI. La réponse immunitaire peut être anti-tumorale ou pro-tumorale. Ainsi, une même tumeur dans deux micro-environnements différents sera traitée de diverses manières¹. Par exemple, pour qu'un LT s'active, des signaux co-stimulateurs provenant des

CPA sont nécessaires. Cependant, les cellules tumorales stimulent de manière insuffisante les CPA, ce qui entraîne une expression inadéquate du CMH-II, des molécules co-stimulatrices et de la production de cytokines. L'interaction entre les CPA et les LT est sous-optimale, ce qui conduit à une anergie des LT².

1.4.3 La réponse anti-tumorale du système immunitaire : l'immunosurveillance

Durant cette phase, l'immunité innée et l'immunité adaptative travaillent afin de détecter et détruire les cellules transformées avant qu'elles ne deviennent hors de contrôle¹.

Il est probable que, dans de nombreux cas, cette étape aboutisse à la destruction totale de toutes les cellules cancéreuses. Paradoxalement, une telle issue est très difficile à observer car les signes cliniques n'apparaissent jamais. Cependant, une expansion clonale de LT est détectée lors de la régression de la tumeur²⁸.

Dans de nombreuses études, l'immunité adaptative, plus spécifique que l'immunité innée est le pilier de la lutte anti tumorale^{18,23,29}. En outre, une coordination fructueuse est nécessaire entre l'immunité innée et adaptative sans quoi la réponse adaptative est insuffisante et tend à être pro-tumorale.

1.4.3.1 Les acteurs de l'immunité innée

Les cellules de l'immunité innée possèdent deux activités : l'une directe, conduisant à la mort de la cellule tumorale, et l'autre indirecte par sécrétion de cytokine. Les cytokines forment une boucle de rétrocontrôle positif ou négatif. Cependant le phénotype anti ou protumoral est dicté par le micro environnement tumoral. L'activité pro tumorale est l'une des clefs de l'échappement des cancers et une nouvelle voie thérapeutique intéressante. Dans ce paragraphe nous verrons le rôle biduel des principales cellules de la réponse innée.

1.4.3.1.1 Les cellules Natural killer

Les cellules NK sont de gros lymphocytes granuleux, n'appartenant ni à la lignée B ni à la lignée T ; ils représentent 2 à 18% des lymphocytes de la circulation générale. Ces leucocytes sont CMH-indépendants c'est à dire non spécifiques d'antigènes.

Les cellules NK ont principalement une fonction anti-tumorale. Directement, les cellules NK assurent la destruction de la tumeur par :

- Dégranulation et libération de perforines et de granzymes (Toll like receptor)^{8,30},
- Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps ou ADCC (antibody dependant cell cytotoxicity) : l'anticorps se lie aux cellules tumorales puis est reconnu par le fragment cristallisable des immunoglobulines d'isotype G via le récepteur FcγRIII (CD16) des cellules NK. La cellule NK détruit ainsi la cellule tumorale,
- Destruction via les récepteurs de mort cellulaire. Une fois les ligands FasL et TRAIL (Tumor necrosis factor related apoptosis ligand) reconnus par leurs récepteurs respectifs Fas et TRAI des cellules NK, la cellule tumorale meurt par apoptose³⁰.

Indirectement, la sécrétion de TNF- α et d'IFN- γ et d'IL-12 a pour but de stimuler l'immunité innée et adaptative. La sécrétion d'IFN γ favorise l'expression de récepteurs co-stimulateurs par les LT CD8³⁰, le phénotype LTh₁¹⁴ et l'activation des macrophages³¹. L'IL-12 assure aussi l'engagement des LTh₁¹. L'IL-2 sécrété par les LTh₁ stimule la prolifération des NK^{14,30}. En revanche, le TGF- β réduit le fonctionnement des NK pouvant aller jusqu'à l'anergie de celles-ci. Les LTreg inhibent par cette voie l'activité des cellules NK¹⁴.

1.4.3.1.2 Les cellules Natural Killer T

Il s'agit d'une sous-population spécifique de lymphocytes T présentant certaines caractéristiques des lymphocytes T, comme la présence du TCR, et exprimant certains marqueurs des cellules NK¹². Les NKT reconnaissent les glycolipides tumoraux présentés par les CPA via leur récepteur CD1d ayant une structure proche du CMH-I^{12,32}.

Ces cellules ont une activité cytotoxique propre, par le biais de perforines et de granzymes ainsi que par l'expression Fas¹². Ces cellules ont également la capacité de produire rapidement de fortes quantités de cytokines, notamment l'IFN- γ ¹². Les Natural Killer T sont les premières barrières naturelles de l'immunité anti-tumorale aux côtés des NK grâce à leur rôle de vigie, détectant et détruisant précocement les cellules transformées.

1.4.3.1.3 Macrophages associés aux tumeurs

Les monocytes se différencient dans les tissus en macrophages¹. Acteur majeur de l'inflammation, le TAM (macrophage associés aux tumeurs) assure quatre missions : la phagocytose, l'ADCC, le rôle de CPA et une fonction endocrine¹. Le recrutement des TAM est contrôlé par des facteurs de croissance comme le VEGF, les chimiokines et le C5a qui est une molécule issue de la cascade d'activation du complément³³.

L'action des TAM est anti-tumorale si le phénotype est de type M1 alors qu'elle est protumorale si le phénotype est M2¹². Le phénotype n'est pas fixe : il varie en fonction du micro-environnement. La balance M1/M2 déterminera leur rôle au sein de la tumeur³³.

1.4.3.1.3.1 Macrophages associés aux tumeurs de type 1

Le TAM M1 est activé par la voie classique des macrophages, c'est à dire une action conjointe d'un CPA activé⁴ et d'IFN- γ ³³. Il est amené à détruire les cellules tumorales, à activer la réponse adaptative pour l'expression de CMH-II³³ et à produire des cytokines pro-inflammatoires comme IL-1, IL-6, IL-12, IL-23 ou TNF α . La fonction anti-tumorale domine, bien que l'IL-23³³ ou le TNF α ¹ puissent avoir des actions favorisant le développement tumoral.

1.4.3.1.3.2 Macrophages associés aux tumeurs de type 2

Ils représentent la majorité des TAM. L'engagement vers le phénotype M2 est dû à l'activation des macrophages par la voie alternative sous l'influence de M-CSF (macrophage colony stimulating factor)³⁴, d'IL-1, d'IL-4, d'IL-10, d'IL-13 et de TGF- β . Ces cytokines sont sécrétées par les cellules tumorales et les LTreg^{4,12,33}.

L'action protumorale est due principalement à une immunosuppression passant par :

- La diminution de l'activation des LT par réduction de la production d'IL-12, une expression d'IDO (indoleamine 2,3 dioxygénase), d'arginase I et une sur-expression de PDL1 (Programmed death ligand 1) ³⁴,
- Les macrophages M2 expriment peu de CMH-II, ce qui en fait de très mauvaises CPA. Par conséquence, ils diminuent la présentation d'antigènes des autres populations de CPA ³⁵,
- La sécrétion de cytokines et prostaglandines immuno-suppressives, favorisant le phénotype Th2 ⁸,
- La sécrétion de facteurs de survie et de croissance dont le M-CSF l'EGF (Epidermal growth factor). Ces facteurs agissent sur le remodelage tissulaire et l'angiogenèse³⁵.

Ce sont des acteurs nécessaires à l'invasion tumorale et aux mécanismes métastatiques via leur production de prostaglandines, IL-1, IL-6 et TNF α ³⁵.

1.4.3.1.4 Polynucléaires neutrophiles

Ce sont les leucocytes les plus nombreux. Ils luttent contre les pathogènes, éliminent les débris cellulaires en cas de lésion tissulaire et sécrètent également des cytokines ¹⁴. Le neutrophile agit directement par dégranulation d'enzymes lytiques ou par ADCC via les récepteurs aux compléments (C3a et C5a) et (Fc γ RIIIB) ¹.

A proximité d'une tumeur, ils sont appelés TAN (tumor associated neutrophils). Comme les macrophages, le rôle des TAN est phénotype-dépendant. Le type N1 est principalement anti-tumoral, le type N2, lui, est pro-tumoral ¹². Il semblerait que TGF- β ait un rôle dans l'orientation du phénotype des TAN. Les mécanismes de polarisation restent encore à élucider ³⁵.

1.4.3.1.4.1 Neutrophiles associés à la tumeur N1

Les TAN N1 produisent des cytokines immuno-stimulatrices, TNF- α et IL-12, et de chimiokines. La sécrétion TNF- α permet d'activer les cellules dendritiques et celle des chimiokines attire les LT CD8. Enfin, les cytokines IL-12 favorisent l'activation des LT et

stimulent la polarisation vers le profil T_{h1}³⁵. L'ensemble conduit à lutter contre les cellules tumorales.

1.4.3.1.4.2 Neutrophiles associés à la tumeur N2

Ils représentent la majeure partie des TAN. Ils favorisent une immunosuppression, stimulent la croissance tumorale par production de facteurs angiogéniques et d'enzymes dégradant la matrice extracellulaire³⁶, notamment l'arginase qui est une enzyme dégradant l'arginine. La diminution d'arginine empêche la synthèse de la chaîne CD3ζ composant le TCR. Il en résulte un épuisement des LT fonctionnels³⁵.

1.4.3.1.5 Cellules dendritiques

Nous avons vu que les cellules dendritiques établissent le lien entre l'immunité innée et l'immunité acquise et sont les principales CPA. Comme les cellules NK, elles possèdent une activité anti-tumorale directe mais cette activité reste mineure¹².

Dans un milieu immunosuppresseur, la cellule dendritique diminue la présentation du CMH-II et l'expression des co-stimulateurs. De facto, la réponse adaptative antitumorale décline. De plus, la présentation de TAA sans co-stimulation induit les phénomènes de tolérance périphérique¹².

1.4.3.1.6 Cellules myéloïdes suppressives

Les MDSC (cellules myéloïdes suppressives) dérivent des progéniteurs de la lignée myéloïde et sont produites dans la moelle osseuse. Elles se différencient via le GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) ou le FLT-3 (FMS- related tyrosine kinase 3) et de cytokines en macrophages, en granulocytes et en cellules dendritiques. Cependant, la présence de la cyclooxygénase-2, du VEGF et du TGF-β dans le micro-environnement tumoral inhibent leur maturation et induisent un phénotype immunosuppresseur¹⁰. L'effet est réversible par le blocage du récepteur TGF-β1 des MDSC²⁶.

Les MDSC limitent la migration des LT naïfs dans les ganglions par diminution de l'expression de la L-sélectine (CD62L). Le pool de LT activé au sein de la tumeur s'amenuise²⁶. Les LT spécifiques sont éliminés par contact direct avec les MDSC³⁷. Ces cellules peuvent

également se lier à TIM3 (T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3), un récepteur inhibiteur des lymphocytes T : le lymphocyte demeure quiescent²⁶. Indirectement, le MDSC provoque une déplétion en acides aminés en captant la cystine et en sécrétant de l'arginase et de l'IDO. La diminution de cystéine, d'arginine et de tryptophane a pour effet un dysfonctionnement des LT^{26,34}. La sécrétion d'IL-10 et de TGF- β par les MDSC conduit à la formation de LTreg^{34,26}. Cela participe à l'instauration d'un environnement tolérogène.

Les MDSC entraînent également la diminution de l'activation des cellules NK par²⁶:

- Diminution de l'expression des récepteurs NKG2D (Natural killer group 2D receptor), nécessaires à la reconnaissance de leur cible,
- Diminution de la synthèse de la chaîne ζ du CD3 grâce à l'arginase,
- Diminution de la fonction cytolytique des NK.

1.4.3.2 Les acteurs de l'immunité adaptative

L'immunité adaptative est la plus sollicitée et la plus efficace contre une tumeur du fait de sa spécificité. Comme pour la réponse innée, son type de réponse est conditionné par différents facteurs : la présence de différents types cellulaires, la sécrétion de cytokines, la morphologie des cellules tumorales. Cet ensemble permet d'appréhender comment se déroule le développement de l'immunoédition.

1.4.3.2.1 Les lymphocytes T

Ces cellules sont les acteurs principaux de la lutte immunitaire anti-tumorale, notamment lors de la phase d'immunosurveillance et d'équilibre¹⁸ avec certaines différences entre les sous-populations.

1.4.3.2.1.1 Lymphocytes T CD8

Après la reconnaissance de l'antigène par le LT CD8, la cytolysse des cellules tumorales passe par la voie Fas/FasL et la dégranulation d'enzymes lytiques¹⁴.

1.4.3.2.1.2 Lymphocytes Th₁

Le LT CD4 a également une action cytolytique comme le LT CD8 bien que moins importante^{12,38}. Sa principale fonction est le contrôle de la réponse immunitaire via la sécrétion de molécules.

Pour rappel, les LTh₁ se polarisent dans un micro-environnement immuno-stimulateur via l'IL-12 et l'IFN γ ¹⁴. Leur fonction anti-tumorale est illustrée par :

- Une activation des macrophages type M1, des LT CD8, des cellules NK T et NK et des autres cellules de l'immunité innée anti-tumorale³⁸,
- Une sécrétion de cytokines anti tumorales l'IL-2, l'IL- 12, l'IFN γ ¹²,
- Une sécrétion CXCL (motif CXC chimiokine ligand) 9 et 10 , favorisant l'infiltration des LT CD8 dans les tissus³⁸,
- Une augmentation de l'expression des CMH et des récepteurs de co-stimulation via l'IFN- γ .

L'IFN- γ a aussi des effets anti-prolifératifs, pro-apoptotiques et inhibiteurs de l'angiogénèse³⁸. Les cytokines sécrétées permettent une auto-activation des LTh₁ et donc entretiennent l'activité anti-tumorale^{4,38}.

1.4.3.2.1.3 Lymphocytes Th₂

Le LTh₂ a un profil pro-tumoral:

- Il favorise l'activation des TAM M2 et TAN 2^{33,35},
- L'IL-4 qu'il sécrète est liée à une sur-expression de protéines anti-apoptotiques (FLIP et Bcl-xL), ce qui favorise la survie des cellules tumorales⁸.

Il convient donc de chercher à favoriser un phénotype Th₁ plutôt que Th₂ dans la conception d'un médicament anti-tumoral⁸.

1.4.3.2.1.4 Lymphocyte Th₁₇

La double composante des LTh₁₇ est un élément clef de la réponse immunitaire. Il peut être pro ou anti-tumoral. Leur activité anti-tumorale dépend principalement de leur production d'IFN γ . A contrario, leur activité pro-tumorale dépend de l'IL-17⁴⁹.

Le LTh₁₇ a un rôle pro-tumoral en⁴⁹:

- Produisant une grande quantité d'Il-17 qui est pro-angiogénique,
- Favorisant le recrutement des MDSC dans l'environnement tumoral,
- Se convertissant en LTreg.

Mais le LTh₁₇ peut avoir un rôle anti-tumoral en⁴⁹:

- Se convertissant en LTh₁ via IFN γ ,
- Favorisant le recrutement et l'activation des LT CD8 et des LB.

Les LT Th17 sont une partie intégrante des mécanismes d'immuno-subversion déployés par les tumeurs.

1.4.3.2.1.5 Lymphocytes Treg

Le LTreg a pour rôle de réguler les populations de lymphocytes T. Son action passe par l'inhibition des fonctions effectrices des lymphocytes T CD4, CD8 ainsi que des NK et NK T^{1,12}. De nombreuses lignées cancéreuses sont capables d'induire le recrutement des LTreg et leur prolifération. Les LTreg s'y accumulent et représentent la majorité des lymphocytes dans les stades avancés³⁹. Une telle prolifération de LTreg dans le micro-environnement tumoral est le plus souvent due à la présence de nombreuses cellules dendritiques tolérogènes, convertissant les LT CD4 matures en LTreg³⁹.

L'action immuno-régulatrice des LTreg passe^{14,12}:

- Par la production de diverses cytokines, dont TGF- β et l'IL-10 Ces cytokines sont capables de diminuer l'expression des CMH et des récepteurs de co-stimulation. Elles

diminuent également l'activité anti-tumorale des macrophages, des cellules NK, la maturation des cellules dendritiques et inhibent la fonction des lymphocytes LT CD8,

- Par la production de TGF- β . Il permet une augmentation du nombre de LTreg, créant une boucle de rétrocontrôle positif,
- Par l'expression de récepteurs inhibiteurs des LT tels que CTLA-4 et PD1. Elles induisent une tolérance périphérique entraînant l'anergie des lymphocytes effecteurs ou leur conversion en LTreg,
- Par la synthèse d'IDO, une enzyme dégradant le tryptophane. L'activité des CPA est diminuée et l'activation des LT est bloquée.

1.4.3.2.2 Lymphocytes B

L'action anti tumorale des LB passe par la production d'anticorps spécifiques d'un TAA. Les anticorps IgG liés aux cellules tumorales sont reconnus par les macrophages et les NK via leur région Fc (fragment cristalisable) ou le CD16. Cette fixation entraîne la lyse des cellules tumorales. La liaison des antigènes de tumeurs aux anticorps peut aussi entraîner la cascade classique du complément pour former un complexe immun et donc la lyse des cellules ¹².

1.4.3.3 Inflammation

L'inflammation est la première réponse immunitaire face au processus tumoral. Une inflammation importante est une caractéristique majeure du micro-environnement tumoral. Les différentes cellules recrutées et les cytokines sécrétées sont des marqueurs d'un état pro ou anti tumoral, comme vu précédemment.

1.4.3.3.1 La voie intrinsèque et extrinsèque

L'inflammation peut être due aux cellules tumorales : on parle alors de la voie intrinsèque. Si l'inflammation est antérieure à l'apparition d'un processus tumoral, c'est la voie extrinsèque.

La voie intrinsèque est due à l'inflammation causée de novo par les cellules mutées. L'activation de différentes classes d'oncogènes conduit à l'expression de différentes molécules

liées à l'inflammation, conduisant à la construction d'un micro-environnement pro-inflammatoire favorisant le développement tumoral comme les espèces réactives de l'oxygène⁴⁰.

La voie extrinsèque correspond à une inflammation chronique préexistante. Elle induit une série de mutations génétiques, permettant donc l'initiation et la promotion tumorale⁴⁰. L'inflammation chronique serait à l'origine du cancer de l'estomac suite à l'infection par *Helicobacter pylori*, ou du cancer du côlon lors de maladies auto-immunes⁴.

1.4.3.3.2 Une réponse inflammatoire anti-tumorale

Une inflammation anti-tumorale correspond au recrutement de cellules spécifiques du SI. Sa composante innée fait appel à des TAM M1, des cellules dendritiques fonctionnelles, des cellules NK et des TAN N1. Sa composante adaptative se base sur les LTC et les LTh₁⁴. Certaines cytokines inflammatoires comme l'IFN- γ ou le TNF- α , Il-2 présentent une activité anti-tumorale marquée dans le micro-environnement¹.

Ce profil inflammatoire anti-tumoral est associé à une augmentation de la survie des patients.

1.4.3.3.3 Une inflammation au service de la tumeur

L'inflammation pro tumorale permet le recrutement de TAM M2, de nombreuses MDSC et un phénotype Th₂, Th₁₇ et Treg. Les cytokines IL-6, IL-23, IL-17 sont présentes dans un micro-environnement pro-tumoral⁴.

1.4.4 Echappement au système immunitaire

La dernière étape de l'immunoédition est la rupture de l'équilibre entre destruction et prolifération tumorale. Suite à la sélection positive, les cellules tumorales acquièrent la capacité d'échapper et de déprimer le système immunitaire. Les cellules tumorales mettent en œuvre deux mécanismes. Le premier consiste à diminuer la réponse immunitaire envers la tumeur : c'est l'immunosuppression. Le deuxième consiste à inverser l'activité anti-tumorale du SI en pro-tumorale : c'est l'immunosubversion^{2,41}. L'incapacité à initier et à maintenir une immunité anti-tumorale adéquate conduit à l'invasion du cancer, puis au décès de l'individu.

1.4.4.1 Modifications intrinsèques des cellules tumorales

Les cellules cancéreuses sont d'abord résistantes aux SI grâce aux caractéristiques phénotypiques. Elles ne sont alors plus reconnues par le SI, résistent aux attaques cytolytiques et favorisent l'immunosubversion en exprimant des ligands inhibiteurs. L'altération de l'immunogénicité est liée à deux mécanismes¹⁴: la diminution ou la perte d'expression de TAA et l'altération de l'apprêtement du CMH-I. Les cellules immunitaires ne perçoivent plus les tumeurs comme un danger et ne cherchent donc pas à les détruire.

Les cellules tumorales résistent à la voie perforine-granzyme, aux ligands de mort cellulaire et aux signaux d'apoptose. Par exemple, elles résistent à la granzyme et à la perforine par la synthèse d'inhibiteurs (serpine PL9/SP16)⁴². Un autre mécanisme diminue l'expression des récepteurs de mort cellulaire comme les récepteurs Fas et TRAIL^{8,18}. Certaines protéines inhibent la caspase 8, Bcl-xL ou FLIP, responsables de la cascade d'activation de la voie Fas/FasL¹⁸.

Certaines cellules tumorales ont la capacité d'inhiber la co-stimulation directement sur les cellules du SI. Sans co-stimulation, le lymphocyte rentre dans un état d'anergie, puis meurt par apoptose. Les deux principaux récepteurs inhibiteurs exprimés sont CTLA4 et PD1¹⁰. Des essais cliniques récents ont démontré que le blocage de PD1 ou de CTLA4 améliore les réponses anticancéreuses¹⁴. La FDA (food drug administration) a autorisé l'utilisation d'anticorps anti-CTLA4, ipilimumab (Yervoy) pour le traitement du mélanome métastatique en 2011¹⁴.

1.4.4.2 Mécanisme indirecte d'immunosubversion et d'immunosuppression

1.4.4.2.1 Recrutement de cellules régulatrices

Le recrutement des cellules immuno-régulatrices dans le micro-environnement tumoral est un des mécanismes majeurs permettant l'échappement tumoral.

Nous pouvons citer :

- Le LTreg qui a la possibilité de réguler les populations lymphocytaires en induisant leur apoptose, en favorisant un phénotype protumoral ou en diminuant leur activation¹,

- Les MDSC qui présentent d'importantes actions immuno-régulatrices favorisant la progression tumorale²⁶,
- Les TAM M2 connues pour favoriser la croissance tumorale par une production de cytokines immuno-modulatrices dont le TGF- β et l'IL-10¹,
- Certaines populations de lymphocytes B qui peuvent présenter une activité régulatrice¹.

1.4.4.2.2 Les cytokines protumorales

Il a été mis en évidence que les cellules tumorales et les cellules du SI sécrètent de nombreuses cytokines pro-tumorales induisant une boucle de rétrocontrôle positif et un micro-environnement tolérogène. Au sein des tumeurs avancées, les observations montrent une augmentation des cytokines de type Th2 (IL-1, IL-6, IL-10) favorables aux tumeurs, parallèlement à une diminution de la production de cytokines de type Th1 (IL-2, IFN γ) présentant un rôle majeur dans l'amplification des réponses des cellules anti-tumorales¹².

Certaines cytokines influent directement sur les cellules tumorales. Par Exemple, IL-1, IL-6, CSF1 (colony stimulating factor 1), ainsi que de multiples chimiokines telles que l'IL-8 favorisent la prolifération et confère des propriétés anti-apoptotiques aux tumeurs. Le TGF- β inhibe la prolifération cellulaire du SI et stimule l'angiogénèse¹².

De plus, l'activation de NF- κ B (Nuclear factor kapa B) par les cytokines sécrétées peut induire la production de monoxyde d'azote, d'espèce réactive de l'oxygène et de peroxy-nitrites. Le stress oxydatif résultant, endommage l'ADN des cellules adjacentes¹².

1.5 Immunothérapie

L'idée d'utiliser le système immunitaire pour traiter le cancer n'est pas nouvelle. Il faut remonter à la fin du 19^{ème} siècle avec le Dr William Bradley Coley, un chirurgien américain. Il injecta des bactéries dans les carcinomes osseux inopérables dans le but de déclencher des réactions immunitaires ^{1,41}.

L'immunothérapie est donc un traitement qui utilise les molécules et les cellules du SI pour contrôler et détruire les cellules cancéreuses. L'atout principal de l'immunothérapie anti-cancéreuse est sa spécificité, d'où la diminution des effets indésirables. Pour ce faire, chaque effecteur du SI peut être utilisé, de l'immunité innée en passant par la spécificité et la mémoire à long terme de l'immunité acquise pour détruire directement les cellules tumorales. Enfin, le changement du micro-environnement est également une voie thérapeutique dans l'arsenal anti-tumoral.

L'immunothérapie est dite « active » ou « passive ». L'immunothérapie active engendre, renforce et mobilise une réponse du système immunitaire du patient contre la tumeur. Les stratégies vaccinales ou les inhibiteurs de points de contrôle immunitaire sont à l'études. L'immunothérapie passive a pour but de cibler directement les cellules tumorales. Les ACT (Adoptive cellular therapy) ou les anticorps monoclonaux ciblant des antigènes tumoraux définis sont des stratégies passives ^{14,41,43}.

1.6 La thérapie cellulaire adoptive à base de lymphocyte T

1.6.1 Définition

L'ACT est une thérapie prometteuse qui exploite les propriétés anti-tumorales des lymphocytes pour éradiquer les cellules tumorales ⁴¹. Elle consiste à la perfusion de lymphocyte T autologue ou non dirigé contre le cancer. En 1988, la première ACT se fit par injection de lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL) chez un patient atteint de mélanome ¹⁴². Au cours des trois dernières décennies, l'ACT à base de LT a démontré son potentiel à induire des réponses cliniques spectaculaires ⁴¹. De nombreux essais cliniques sont en cours, récapitulés dans le Tableau 3.

Les avancées technologiques ont conduit les chercheurs à améliorer constamment la thérapie à base de cellules T. Ils visent une utilisation à grande échelle et une meilleure efficacité à court et long terme tout en minimisant les effets indésirables. L'ensemble ces thérapies utilise l'injection de lymphocytes autologues afin d'éviter tout risque de rejet. A l'avenir, des techniques devront être étudiées pour lever ce frein.

Les résultats prometteurs de l'immunothérapie sont décrits comme la «percée scientifique de l'année» en 2013 ⁴⁴. Ainsi l'industrie pharmaceutique investit massivement dans le développement de l'ACT. Par exemple, le géant pharmaceutique Novartis a fait équipe avec l'Université de Pennsylvanie en 2012 et a investi 100 millions de dollars pour développer la thérapie de CAR-T cell (lymphocyte T CAR). Plus récemment, en décembre 2013, une nouvelle entreprise de biotechnologie, Juno Therapeutics, est créée avec un investissement initial de 145 millions de dollars ; elle développe des thérapies de cellules T à base de TCR modifiés et de CAR ¹⁴.

Nous nous intéresserons aux TIL puis aux cellules T induites par des antigènes : celles avec un TCR modifié et celles avec un récepteur antigénique chimérique.

1.6.2 Les lymphocytes infiltrant la tumeur

L'isolement et l'expansion des TIL pour la thérapie adoptive ont été mis au point par Rosenberg en 1988 ⁴⁵. Leur préparation s'effectue à partir de tissu cancéreux découpé en morceaux ensuite cultivés dans un milieu contenant de l'IL-2 pendant environ deux semaines ⁴¹. Après une phase d'expansion, les lymphocytes T ainsi obtenus sont injectés au patient. Cette approche tente de rétablir la fonction anti-tumorale des lymphocytes T ⁴⁶.

L'utilisation de TIL a été efficace pour traiter le mélanome ^{14,41,45}. Néanmoins, la régression du cancer était transitoire. L'hypothèse est que cela serait dû à un manque de persistance des cellules transférées in vivo. En 2002, une lymphodépletion consécutive à une chimiothérapie avant l'infusion de cellules adoptives a montré une meilleure persistance des cellules et une amélioration de l'efficacité ⁴¹. La chimiothérapie épuise les LTreg et d'autres cellules immunosuppressives comme les MDSC et augmente le niveau de cytokine IL-7 et IL-15 ^{41,46}.

Cependant, cette thérapie a de nombreux inconvénients dont l'ablation chirurgicale des tissus tumoraux pour la culture TIL ¹⁴, une variabilité inter-patients et inter-cancers significative, un coût élevé et un temps de culture cellulaire long ^{41,47}. D'autres stratégies doivent être conçues pour surmonter ces limites.

1.6.3 Les lymphocytes T induits par les antigènes associés aux tumeurs

Une seconde approche immunothérapeutique permet de produire des lymphocytes T dirigés contre les antigènes du cancer. Elle vise à stimuler in vitro les LT contre un TAA pour déclencher une réponse adoptive à partir de TIL ou de LT du sang périphérique ⁴⁸. Avec l'avènement de la biologie moléculaire, de plus en plus de TAA sont identifiés. Il est possible d'utiliser un pool des LT spécifiques ciblant chacun un antigène exprimé sur les cellules cancéreuses pour une meilleure efficacité ¹⁴. Les LT induits par un antigène cancéreux ont été utilisés avec un certain succès pour traiter le mélanome ⁴⁹.

Cependant, malgré des résultats cliniques satisfaisants, l'induction in vitro d'un TCR spécifique présente plusieurs inconvénients : la présence d'Ag sur des cellules saines provoque des effets indésirables et la diminution de l'expression des TAA par la tumeur

diminue l'efficacité de la thérapie. L'épuisement à long terme du pool de lymphocyte T modifié diminue son activité *in vivo* ¹⁴.

1.6.4 Thérapie à base de lymphocyte T modifié génétiquement

Pour améliorer cette thérapie, les chercheurs visent à reprogrammer un LT pour le diriger vers un Ag souhaité. La spécificité antigénique du TCR peut être modifiée génétiquement et redirigée pour cibler avec succès des antigènes qui sont exprimés par des tumeurs. Ceci pourrait permettre de surmonter les freins de la tolérance périphérique. Ainsi, il serait possible de générer des cellules T plus efficaces pour cibler les tumeurs sans l'exigence d'une activation des cellules T *de novo* chez le patient ². Les progrès dans les méthodes de culture des lymphocytes T et dans l'ingénierie des cellules T modifiées garantissent un nombre suffisant de cellules pour une thérapie viable.

1.6.4.1 Synthèse du lymphocyte T

La synthèse de LT à TCR modifié s'effectue en quatre étapes (Figure 9) : le prélèvement, la sélection du gène d'intérêt, le transfert par vecteur du gène, l'expansion clonale. La première étape de la thérapie génique consiste à isoler à partir du sang périphérique ou de TIL, un LT à haute affinité pour le TAA ciblé ⁴⁷. Ensuite, les chaînes α et β de TCR spécifiques de tumeur sont identifiées, isolées et clonées. Puis le gène est transféré au LT via un vecteur². Les vecteurs sont principalement d'origine virale (lentivirus, rétrovirus). Le système de transposon/ transposase peut être également utilisé ¹⁴. Pour finir une phase d'expansion clonale a lieu pour donner un maximum de cellules efficaces. Les cellules récoltées ciblent désormais spécifiquement un TAA et sont réinjectées au patient ⁴⁷.

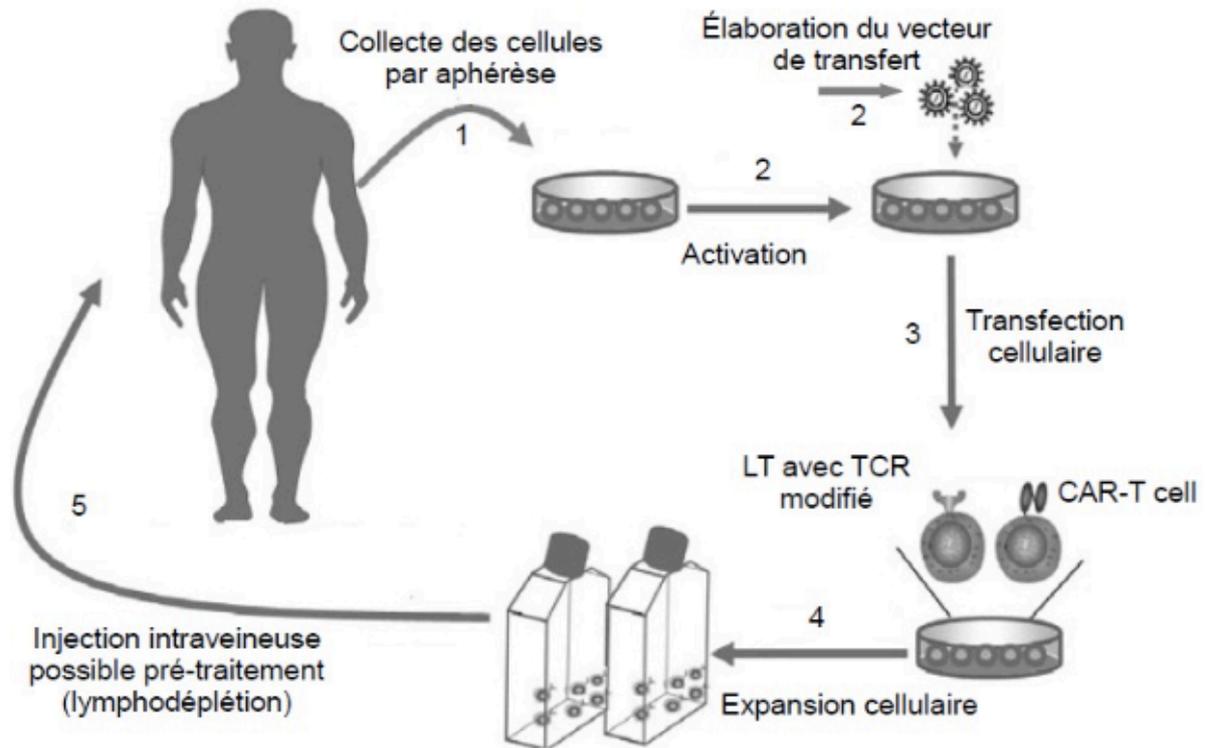


Figure 9 : Les étapes de réalisation d'un transfert de lymphocytes T modifiés ⁵⁰

Récemment, une série de nouveaux essais cliniques a montré des réponses significatives dans divers cancers : le mélanome, le cancer colorectal, le lymphome, le neuroblastome et le sarcome synovial ⁴⁷.

Cependant, différents obstacles dans la thérapie à base de TCR modifié génétiquement sont apparus :

- L'isolement difficile de clones de LT et la faible affinité pour l'Ag cibles limitent le processus de fabrication ⁴⁷,
- La faible affinité de liaison TCR-Ag restreint l'activité. Toutefois, les leçons tirées d'essais cliniques suggèrent qu'un TCR avec une affinité intermédiaire pourrait être le meilleur choix pour éviter la survenue d'effets indésirables en raison des réactions croisées avec des antigènes cancéreux exprimés à des niveaux faibles sur les cellules saines ¹⁴,
- Une toxicité importante due à l'effet Hors-cible,

- La perte de l'expression du CMH par la tumeur empêche la liaison du LT ⁴⁷. La thérapie devient inefficace.

1.6.5 Développement de cellules T avec un récepteur d'origine artificielles

En 1989 l'équipe d'Eshhar met au point un lymphocyte T capable d'exprimer un récepteur ciblant des antigènes sans avoir besoin de liaison au CMH ⁴⁷. En passant la limite de la reconnaissance du CMH, ce néolymphocyte ouvre la possibilité de cibler spécifiquement un antigène tout en ayant les capacités effectrices d'un LT.

Ce nouveau récepteur est un TCR chimérique appelé récepteur antigénique chimérique (CAR). Le CAR se compose d'une partie extracellulaire, scFv (chaîne légère d'un fragment variable d'un anticorps) et d'un domaine intracellulaire CD3 ζ ^{47,51}. Le scFv se lie à des antigènes extracellulaires. Une fois lié à l'antigène, la partie extracellulaire transduit le signal via le domaine CD3 ζ , qui déclenche à son tour les fonctions effectrices du LT pour détruire les cellules cancéreuses ¹⁴.

La thérapie de CAR-T cell présente les avantages suivants : La même cible peut être utilisée pour de nombreux patients. Une variété de molécules de surface cellulaire comprenant des protéines, des protéines glycosylées et des antigènes d'hydrates de carbone peuvent être ciblées. La fonction des CAR-T cells n'est pas affectée par l'expression du CMH.

2 Partie 2 : Lymphocyte T à récepteur d'antigène chimérique

Notre organisme mobilise des moyens de défense efficace contre le cancer. Cependant la pression exercée et le microenvironnement engendre une activité protumoral du SI. L'immunoédition est une arme réversible à double tranchant. En utilisant les effecteurs antitumoraux adaptés, il est possible de combattre le cancer. La thérapie de cellules adoptives était étudiée depuis de longue année, tout d'abord par l'injection de TIL puis par modification génétique du TCR. Enfin l'ACT a évolué vers la synthèse d'un récepteur chimérique. Cette découverte fut prometteuse⁵². La nature synthétique des CAR permet une grande flexibilité dans le choix de la cible^{47,52}. Le passage aux essais cliniques a nécessité le développement d'une méthode robuste, rapide et reproductible de production de CAR-T cell. Depuis une dizaine d'années, les essais précliniques et cliniques dévoilent un potentiel grandissant. En outre, la toxicité hors-cible pose un problème de sécurité d'utilisation. Elle doit être prise en compte dans l'élaboration du futur médicament. Dans cette seconde partie, nous exposerons les caractéristiques des cellules T CAR.

2.1 Structure

Les CAR se composent d'un domaine de liaison extracellulaire, d'une région charnière qui transmet le signal extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine de signalisation intracellulaire (Figure 10) ^{47,52}. Ce récepteur chimérique est en mesure de reconnaître un antigène de surface cellulaire comme les protéines, les glucides et les glycolipides. La reconnaissance de la cible s'affranchit des phénomènes de tolérance au soi, elle est CMH-indépendante ⁵³.

Les différentes populations de LT peuvent être utilisées pour exprimer le CAR. Le choix de la sous-population sera déterminante pour lutter efficacement contre un type de cancer ⁵⁴.

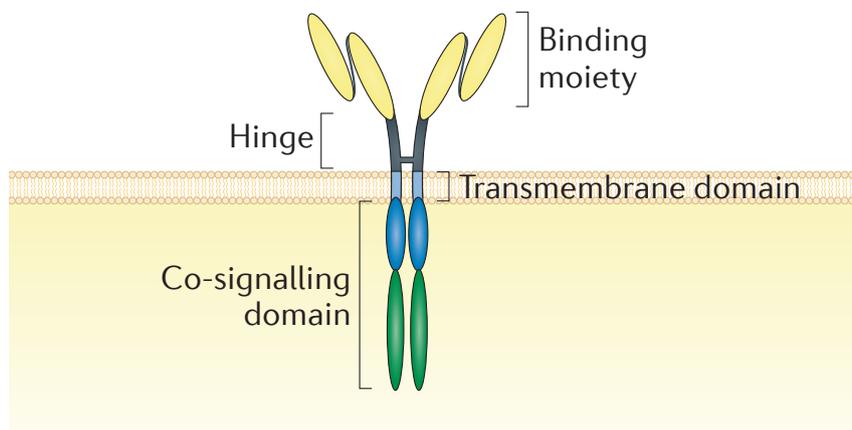


Figure 10 : Structure d'un récepteur d'antigène chimérique ⁵²

2.1.1 Structure de base

Le CAR se compose d'une structure initiale qui au fur et à mesure des années et des recherches s'améliore, s'affine et aboutit à différentes générations. Le but a été d'amplifier le signal avec l'ajout d'un ou plusieurs domaines de co-stimulation ^{55,56}.

A l'origine, la partie extracellulaire d'un CAR se compose de scFv. Le scFv dispose d'une chaîne légère (VL) et d'une chaîne lourde (VH). Il est fusionné à un domaine transmembranaire et au domaine intracellulaire CD3 ζ du TCR (Figure 11) ⁶. Ce récepteur de fusion induit les fonctions effectrices des lymphocytes T. Le scFv cible les tumeurs de façon

similaire à l'interaction antigène-anticorps. Plusieurs études ont démontré l'efficacité du ciblage entre scFv et des antigènes ancrés dans le domaine extracellulaire ⁵⁴.

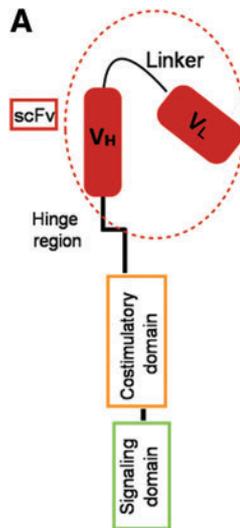


Figure 11 : Schéma de base d'un CAR ⁵⁷

Cette structure est la pierre angulaire de l'évolution des thérapies à base de CAR-T cell. De nos jours, il existe trois générations de CAR (Figure 12) ⁵³.

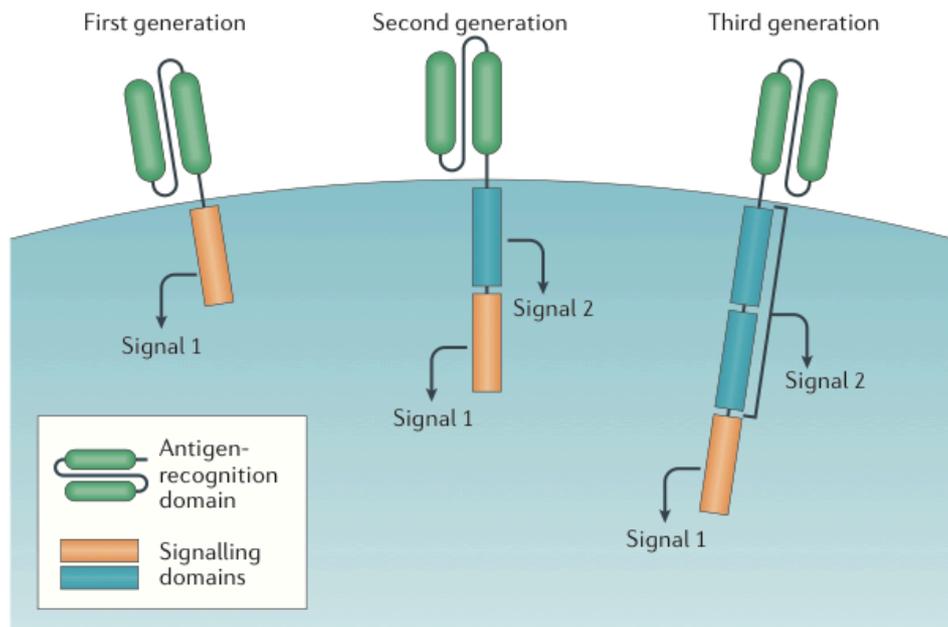


Figure 12 : Les différentes générations de CAR-T cells ⁵⁵

2.1.1.1 Première génération

Le CAR de première génération combine un scFv joint au domaine de signalisation intracellulaire de CD3 ζ (Figure 13). Une fois le scFv lié à l'antigène cible, CD3 ζ s'active et induit un effet cytotoxique via son motif ITAM. Cependant le signal est insuffisant pour engendrer les différentes fonctions d'un lymphocyte T notamment la sécrétion de cytokines. Ainsi la première génération a montré une efficacité clinique limitée ⁵³.

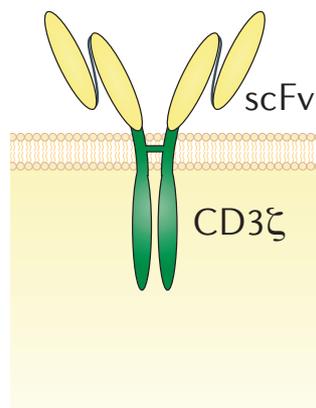


Figure 13 : Schéma d'un CAR de 1^{ère} génération ⁵²

2.1.1.2 Deuxième génération

L'activation complète des LT nécessite un récepteur de co-stimulation (signal 2) comme vu précédemment. Or la première génération en est dépourvue. Les chercheurs ont donc inclus aux CAR un domaine de co-stimulation CD28 en tandem avec des domaines CD3 ζ (Figure 14) ⁵⁸. Le premier signal se fait par le TCR-CD3 ζ , mais le second signal, ou co-stimulation, est médié par la ligature de CD28 par CD80 ou CD86 ⁵².

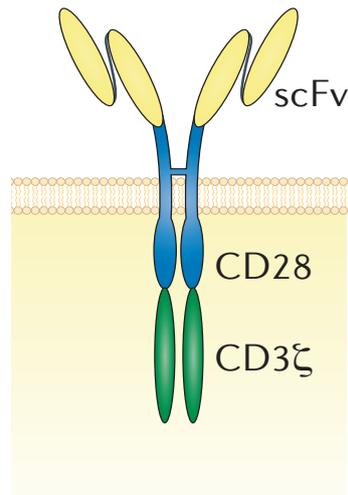


Figure 14 : Schéma d'un CAR de 2^{ème} génération à domaine de co-stimulation CD28 ⁵²

Le CAR de deuxième génération engendre la prolifération des LT in vivo, la lyse des cellules cibles et la sécrétion d'IL-2 ⁵². Il a également été démontré que d'autres domaines co-stimulateurs, tels que CD27, OX40 et 4-1BB (antigène CD137), offrent des améliorations in vivo similaires dans la fonction et la persistance des lymphocytes T ⁵⁶. Des études seront nécessaires pour déterminer le meilleur domaine de co-stimulation en fonction de la cible désirée.

2.1.1.3 Troisième génération

La troisième génération CAR combine toujours un scFv et un domaine CD3ζ mais avec deux domaines de co-stimulation. Les domaines de co-stimulation sont ceux également utilisés dans la deuxième génération : CD28, 4-1BB ou OX40 ⁵⁶.

Dans les études précliniques, les CAR-T cells de troisième génération ont démontré une efficacité supérieure anti-tumorale par rapport à la deuxième génération CAR^{59,60}. Un essai clinique recrute actuellement des patients pour comparer l'efficacité anti-tumorale de deuxième génération par rapport à la troisième (NCT01853631). Les patients atteints de lymphome non hodgkinien, de leucémie lymphoïde aiguë B ou de la leucémie lymphoïde chronique seront traités avec un mélange de cellules T exprimant soit un CAR anti-CD19 de deuxième génération (CD3ζ, CD28) ou d'une troisième génération (CD3ζ, 4-1BB, CD28). Les

résultats de cet essai pourraient déterminer si les futures CAR-T cells doivent être conçues avec un ou deux domaines co stimulateurs ⁵⁵.

2.1.2 Rôle de la pharmacodynamique dans l'activation des CAR-T cells

La complexité de l'activation de CAR-T cell suscite de multiples questions. Une meilleure compréhension des mécanismes pharmacodynamiques permettra une construction optimale de cette nouvelle classe médicamenteuse.

Les différents éléments structuraux de CAR œuvrent ensemble et influencent ainsi la qualité et la quantité du signal fournit. L'optimisation du signal passe par l'affinité de liaison de scFV, l'emplacement de l'épitope, la taille de l'espace extracellulaire, les éléments de co-stimulation et le motif ITAM de transduction du signal ⁵². L'ensemble de ces éléments est déterminant pour l'activité du lymphocyte T (Figure 15). Si le signal est insuffisant (hypoactivité) cela mène à l'anergie. A l'inverse, si le signal dépasse le seuil d'hyperactivité cela conduit à l'activation de la mort cellulaire induite ou AICD (activation induced cell death). Seul un signal suffisant génère l'efficacité clinique désirée ⁶¹.

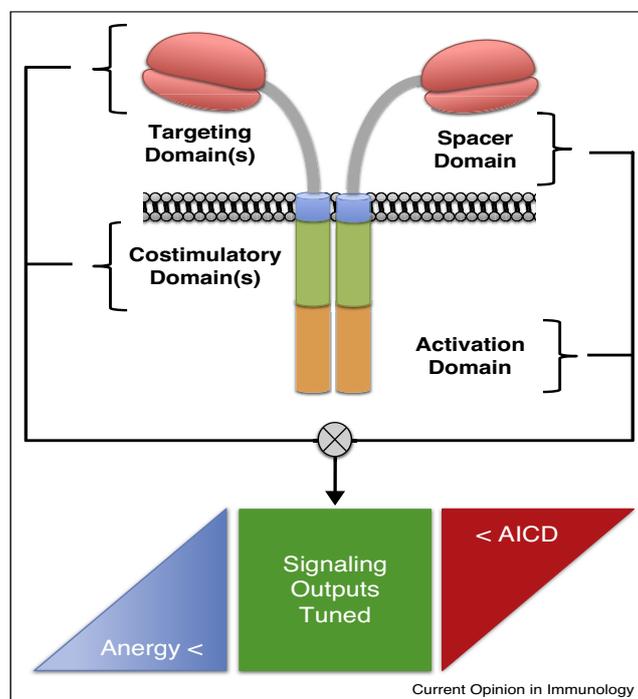


Figure 15 : Un récepteur d'antigène chimérique ⁶¹

2.1.2.1 Le domaine extracellulaire

La conception de CAR peut s'effectuer à partir de sources multiples : des anticorps, des ligands naturels, des peptides, des haptamères. Cependant la plupart des CAR-T cells étudiées sont construites avec scFv provenant d'anticorps murins. Les caractéristiques de scFv modulent la sécurité et ou l'efficacité des cellules CAR ⁵⁶.

Par exemple, le niveau d'affinité du CAR a été identifié comme un moyen permettant d'atténuer les effets toxiques potentiels. La densité de CAR exprimée à la surface extracellulaire influence la cytolyse de la cellule cible. Ainsi une faible densité de CAR permet aux cellules de survivre alors qu'une forte densité provoque la lyse de la cellule ⁵⁶.

2.1.2.2 Les domaines transmembranaires : Charnière et domaine d'espacement

Le scFV est relié au domaine d'activation intracellulaire par l'intermédiaire de domaines charnières, d'espacement et transmembranaires. Des études récentes ont démontré que ces domaines ont un impact significatif sur la fonction des cellules CAR-T et peuvent être optimisés pour améliorer liaison à l'antigène et la signalisation. Notamment le domaine d'espacement est nécessaire pour des épitopes de membranes proximaux alors qu'un épitope de membrane distale est lié sans élément d'espacement extracellulaire ⁵⁶. Second exemple, le domaine d'espacement dérivé d'Ig G1 semble interagir avec les cellules du système immunitaire inné exprimant les récepteurs Fc (macrophages, cellules NK), indépendamment de leur spécificité antigénique, ce qui entraîne des effets néfastes hors cible. En outre, ces mêmes domaines ont contribué à la AICD et à la clairance prématurée des cellules CAR-T dans des modèles de xénogreffes ⁶². Cette éventualité doit être gardée à l'esprit pour les développements futurs ⁶³.

2.1.2.3 Les domaines intracellulaires

Le domaine CD3ζ se constitue d'ITAM. La phosphorylation des tyrosines de la chaîne zêta entraîne le recrutement de ZAP-70 puis phosphoryle différente kinase pour aboutir à l'activation de facteurs de transcription NFAT (nuclear factor of activated T-cell), NF-κB et

ATF2 (activating transcription factor 2) (Figure 16). Cette voie est la plus couramment utilisée pour transmettre l'activation du CAR. Néanmoins, différents domaines intracellulaires pourraient médier l'activation du CAR-T cell, comme par exemple le domaine DAP12 (DNAX-Activation protein 12) ⁶⁴. Des essais avec des cellules NK exprimant un scFV fusionné à DAP 12 démontre une performance plus robuste que le CAR à base CD3 ζ sur les cellules NK ⁶⁵. Plusieurs années de recherche sont encore nécessaires afin d'optimiser le domaine intracellulaire.

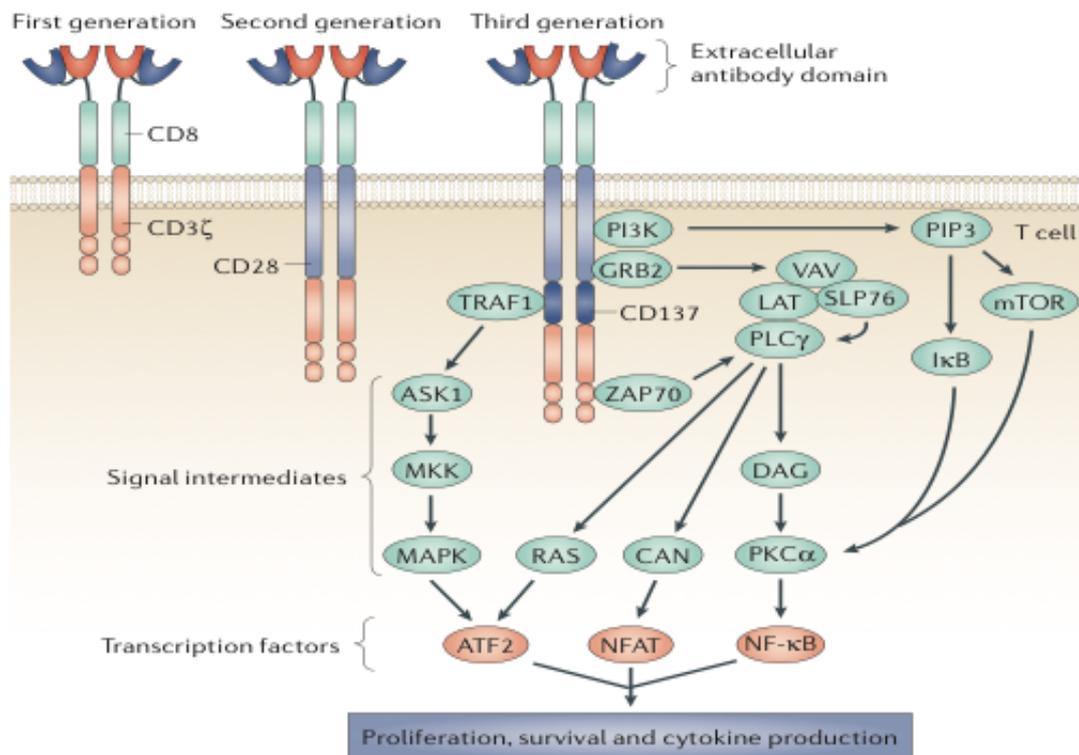


Figure 16 : Cascade de transduction du signal du CAR-T cell ⁴⁸

2.1.2.4 Domaine de co-stimulation

La co-stimulation mène à une activation complète du CAR-T cell. Illustré par la Figure 16, les voies de stimulation des domaines CD28 et 4-1BB empruntent des voies d'activation différentes de ZAP-70. Elles contribuent à l'amplification du signal. Chaque domaine de co-stimulation joue un rôle spécifique. Une compréhension approfondie des voies moléculaires

sera nécessaire pour concevoir les récepteurs les plus efficaces. Les domaines de co-stimulation ont déjà démontré leurs intérêts en voici quelques exemples.

Un CAR de troisième génération contenant un domaine de co-stimulation CD28 avec CD3 ζ , exprimé conjointement avec 4-1BB en position trans, induit un effet antitumoral plus puissant qu'un CAR de troisième génération contenant à la fois CD28 et 4-1BB en position cis⁶⁴.

Le domaine 4-1BB ne possède pas une activité kinase intrinsèque, ce qui permet de shinter une partie de la cascade de transduction du signal par rapport à CD28 (Figure 17). Ceci pourrait expliquer l'activité anti tumorale supérieure par rapport au domaine CD28⁵⁶.

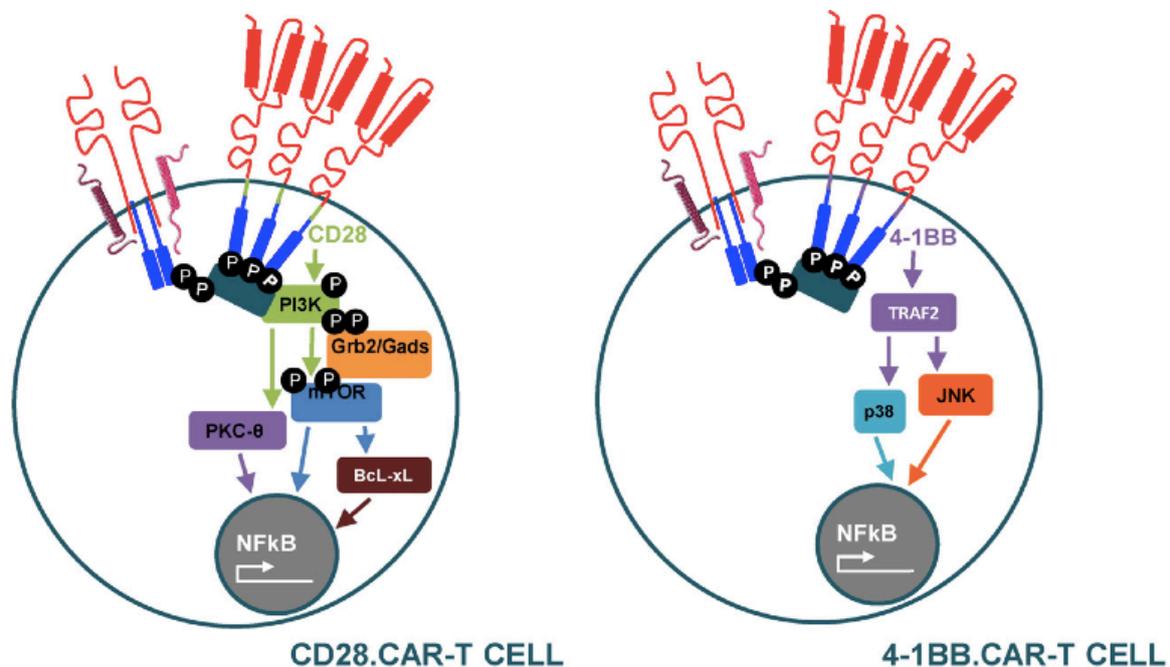


Figure 17 : Signalisation intracellulaire médiée par CD28 et 4-1BB dans les cellules CAR⁶⁴.

À gauche, la signalisation intracellulaire médiée par le domaine CD28, recrute des protéines avec des domaines SH2, tels que PI3K et Grb2 / GAD. Après phosphorylation de mTOR, ceci conduit à la translocation de NF- κ B et donc au maintien de la prolifération CAR-T cells.

À droite, la signalisation intracellulaire médiée par 4-1BB ne possède pas de tyrosine kinase. 4-1BB se lie alors à TRAF2, puis à JNK et p38 conduisant à la translocation de NF- κ B⁶⁴.

Des études cliniques sur un CAR de troisième génération contenant CD28 et OX40 induit une survie supérieure des cellules T comparée à un CAR-T cell costimulé par CD28 seule. En outre, un CAR-T cell CD28-OX40 induit une diminution de la sécrétion d'IL-10, sans altérer la sécrétion d'IFN- γ par rapport à un CAR CD28 de deuxième génération ⁵⁶.

Le CD27 est un autre membre de la famille des récepteurs du TNF ayant un rôle important dans la promotion de la survie des cellules T et de la mémoire immunologique. Dans les modèles de xénogreffes, les CAR-T cell à base de CD27 démontra une meilleure persistance et une activité antitumorale similaire par rapport à ceux avec le domaine 4-1BB et légèrement supérieure à ceux conçus avec CD28. De plus, le CAR avec un domaine CD27 ne promeut pas la synthèse d'IL-2 et donc pourrait avoir des effets bénéfiques en limitant la régulation immunitaire potentielle ⁶⁴.

Pour finir, un dernier domaine de co-stimulation est à l'étude : ICOS L (inductible costimulator ligand). Il appartient à la famille de CD28, son intérêt réside dans l'expansion et la fonction optimale des T_{h17} ⁵⁶. Plusieurs études de CAR-T cells anti-CD19 sont menées actuellement avec différents domaines de co-stimulations (Tableau 4).

2.2 Synthèse des CAR-T cell

Malgré les diverses conceptions de CAR-T cell, son processus d'élaboration demeure constant (Figure 18) ⁶⁶ :

- Collecte sélective de la population de LT issue du patient,
- Activation cellulaire,
- Modification génétique par le biais de particules virales ou d'autres méthodes,
- Expansion de la population pour atteindre un nombre suffisant de cellules,
- Formulation du médicament.

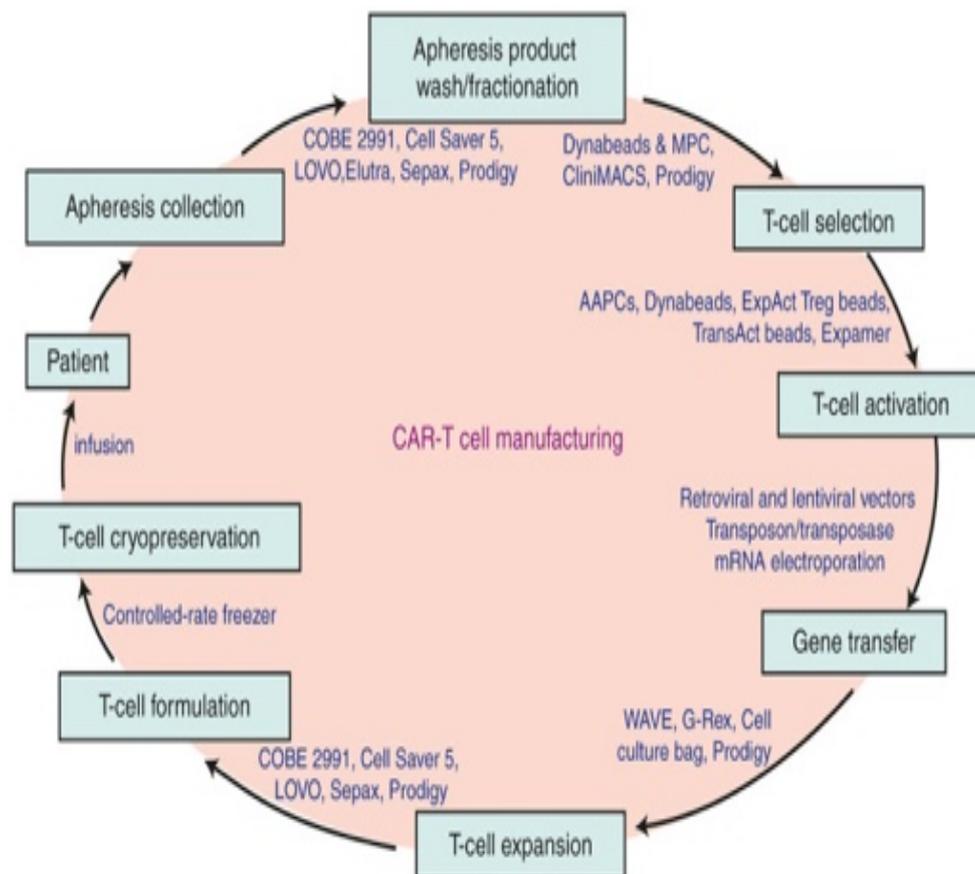


Figure 18 : Schéma des étapes de synthèse d'un CAR-T cell et des exemples de technologies disponibles ⁶⁶

2.2.1 Source de lymphocyte T

Tout d'abord, la synthèse des CAR-T cell débute par la collecte du sang périphérique anti-coagulé par aphérèse. La transfusion est généralement autologue pour éviter tout risque de maladie de l'hôte contre le greffon. A l'avenir, selon les avancées dans le domaine, le sang pourra être celui d'un individu lambda et constituer ainsi une banque de CAR-T cell.

La technique d'aphérèse est une méthode sûre et efficace pour collecter le plus grand nombre de lymphocytes T nécessaires à la culture cellulaire. La force centrifuge permet de séparer en différentes couches les cellules par densité (Figure 19). Ainsi les lymphocytes se retrouvent entre les globules rouges (couche la plus dense) et le plasma (couche la moins dense) ⁶⁷.

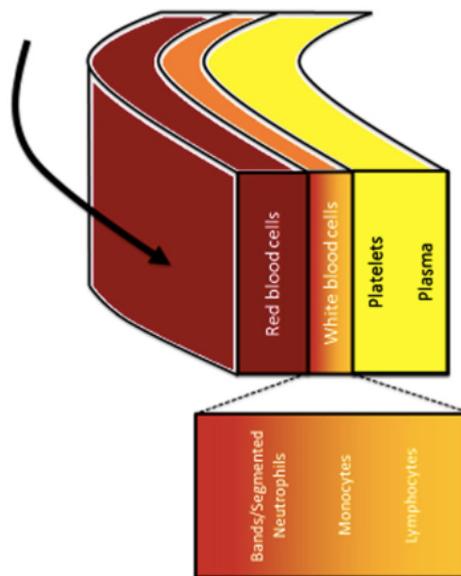


Figure 19 : Schéma de sang périphérique séparé par leucaphérèse ⁶⁷

Puis la sélection des lymphocytes, avec ou sans étape de lavage, permet la purification de l'échantillon. Les critères de sélection sont la densité, la taille des cellules, ou des caractéristiques immunophénotypiques ⁶⁷. Ainsi, deux méthodes sont utilisées (Figure 20) : l'éluatriation par centrifugation à contre-courant et la méthode des anticorps fusionnés à des billes magnétiques ⁶⁷.

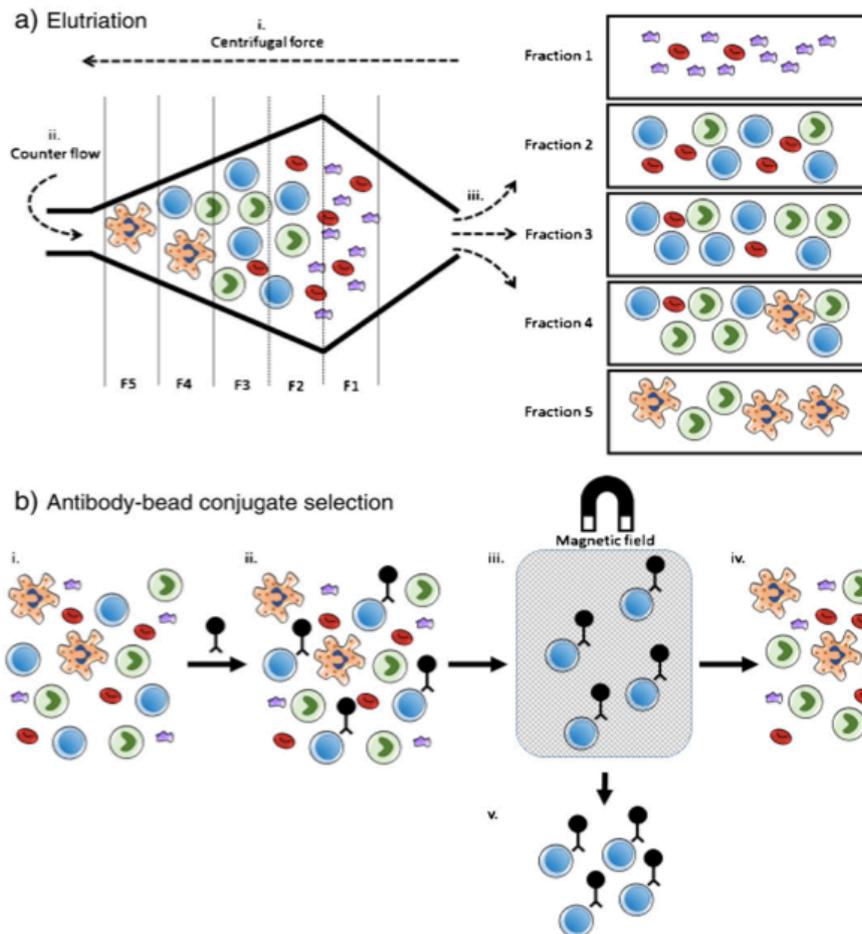


Figure 20 : Les méthodes de sélection des lymphocytes après aphérèse ⁶⁷

L'élutriation sépare les cellules en fonction de leur taille et de leur densité. La force centrifuge s'exerce de manière opposée à l'écoulement du fluide. Ainsi, la première fraction correspond aux cellules de faible densité. A l'inverse, les LT se situent dans les dernières fractions.

La seconde méthode utilise des anticorps monoclonaux fusionnés à des billes magnétiques. Ils peuvent être utilisés pour effectuer une sélection positive ou négative des cellules cibles. Cependant, cette technique coûteuse peut masquer des épitopes cellulaires importants ou altérer les fonctions cellulaires. De plus cette méthode nécessite un traitement supplémentaire pour éliminer les perles magnétiques ⁶⁷.

Les cellules ainsi collectées sont soit cultivées dans des conditions qui favoriseront l'expansion et la stimulation des cellules T ⁶⁸, soit cryo-conservées pour une utilisation future permettant une meilleure flexibilité dans le processus de synthèse ⁶⁶.

2.2.2 Activation des lymphocytes T

Pour recevoir le gène d'intérêt, le lymphocyte T requiert une activation soutenue et adéquate. Elle exige un signal d'activation via le TCR (signal 1) et des signaux de co-stimulation tels que CD28, 4-1BB, OX40 (signal 2).

Les technologies d'activation sont diverses et variées, elles sont à base ⁶⁶:

- De cellules présentatrices d'antigènes,
- De billes magnétiques,
- D'anticorps revêtus de billes magnétiques,
- De nanobilles revêtus d'anticorps,
- D'anticorps anti-CD3.

Une fois l'étape d'activation achevée, le lymphocyte est modifié génétiquement pour exprimer le CAR.

2.2.3 Modification génétique des CAR-T cell

L'expression du récepteur chimérique est une étape clef dans l'efficacité de la ACT à base de CAR-T cell. Il existe de multiples approches, chacune avec ses propres atouts et limites dont : la facilité de production, l'efficacité de la livraison du gène aux cellules cibles, la taille du transcrit, la durée d'expression du transgène, le risque de mutagenèse, l'immunogénicité du vecteur. ⁶⁷. En outre, l'efficacité avec laquelle le vecteur est capable d'entrer dans la population cellulaire est capitale. Cette étape clé détermine la rapidité ou même la faisabilité de la production de cellules en aval.

Il existe différentes méthodes pour transférer le génome codant in vitro. Les vecteurs viraux dont γ -rétroviraux et lentiviraux sont les plus fréquents. Le système transposon/transposase et l'électroporation sont également exploités. Une nouvelle méthode semble prometteuse

CRISPR/CAS 9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, associated system 9)⁶⁶.

Bien qu'une variété de stratégies soit exploitée, la comparaison des techniques avec une efficacité *in vivo* reste à déterminer⁶⁷.

2.2.3.1 Les vecteurs viraux

Le premier protocole de thérapie génique a eu lieu dans les années 1990. Dans ce protocole, deux patients atteints d'immunodéficience combinée sévère ont été traités avec un vecteur rétroviral⁶⁹. Les protocoles à base de vecteurs viraux exploitent les lentivirus et γ -rétroviraux (gamma-rétrovirus). Il s'agit des procédés les plus fréquemment utilisés de transduction de lymphocytes T en raison de leur efficacité, leur coût et leur sécurité⁶⁹.

Les rétroviridés sont des virus enveloppés à matrice et capsid interne avec deux brins d'ARN (acide ribonucléique) monocaténares non segmentés, de polarité positive, allant de 7 à 12 kilobases. Ce sont des virus de classe VI de la classification de Baltimore, c'est à dire qu'ils possèdent un ARN avec une activité transcriptase inverse. La famille retroviridae comprend deux sous-familles, sept genres et cinquante-trois espèces, dont le genre γ -rétrovirus et lentivirus. Au cours de la construction du vecteur viral, les gènes transcrits sont exprimés via des plasmides⁷⁰. Les γ -rétrovirus et lentivirus possèdent un large tropisme cellulaire, une intégration efficace et une expression stable du gène transcrit⁷¹. Vingt pourcents des essais cliniques utilisent le γ -rétrovirus comme vecteur⁷². L'expression de CAR *in vivo* est stable et permet une réponse durable et efficace de la thérapie⁶⁷. Par ailleurs, le vecteur lentivirus possède la capacité de s'intégrer dans les cellules quiescentes ou en division. Le risque d'oncogénicité est réduit. De plus, il offre un transcrit plus long d'environ 2.5 à 5.0 kilobases^{3,67}.

Les inconvénients majeurs des vecteurs viraux sont l'oncogénicité et l'immunogénicité. L'intégration génomique représente potentiellement un risque de transformation maligne. Il existe des cas avérés avec le vecteur γ -rétrovirus⁷³. Elle demeure une possibilité avec des vecteurs lentiviraux. Après des centaines de patients traités, aucune oncogénicité avec des lymphocytes T manipulés par des lentivirus a été rapporté^{6,68}

L'immunogénicité est liée à l'origine exogène du vecteur, en l'occurrence un virus. Des anticorps neutralisants sont potentiellement préexistants chez l'hôte. Ces anticorps sont alors capables d'entraver l'infection virale des cellules cibles ou encore prédisposer un patient à de graves réactions de types allergiques qui empêchent l'utilisation de cette technique ⁶⁷.

2.2.3.2 La méthode électroposon / électroporase

Ces dernières années, les systèmes à base du plasmide transposon, ADN non viral, ont émergé comme un outil potentiel dans la thérapie génique ⁷⁰. Ces éléments génétiques mobiles sont présents dans le règne animal ⁷⁵. La plupart des transposons se compose d'un gène codant pour une transposase et de ITR (répétition terminal inversé). L'enzyme transposase, à travers un mécanisme de "copier et coller", reconnaît les ITR, excise le transposon et l'intègre dans un autre site du génome (Figure 21). Ces éléments jouent un rôle important dans l'évolution des génomes, constituant une fraction considérable de l'ADN chez plusieurs espèces ⁷⁰. Le plasmide est transféré à la cellule par électroporation. L'application intermittente d'un champ électrique déstabilise la membrane cellulaire. La perméabilité est suffisante pour transférer l'électroposon ⁷⁴.

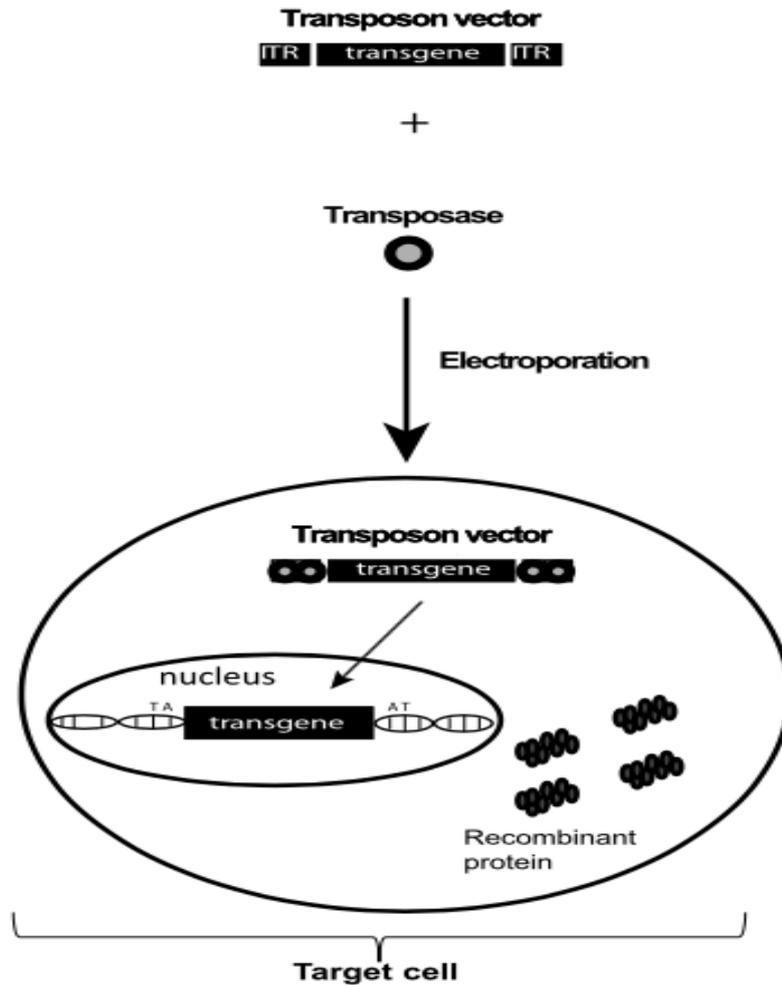


Figure 21 : Schéma de l'intégration d'un gène par le système transposon/transposase⁷⁰

Pour assurer une utilisation efficace et sûre, les transposons ont été divisés en deux plasmides, l'un contenant la séquence codant pour la transposase et l'autre codant pour le CAR⁷⁰. Le transfert dans la cellule s'effectue par électroporation.

Cette conception a les avantages par rapport aux vecteurs viraux de :

- Diminuer les coûts de production. La genèse de plasmides est plus rapide et moins coûteuse que la production de vecteurs viraux,
- Accroître la biosécurité en impliquant uniquement la manipulation de plasmides,
- Diminuer l'immunogénicité.

Cependant, malgré ces avantages, les vecteurs à base de transposon d'ADN ont encore besoin d'assistance pour une absorption cellulaire efficace. L'activité peut donc varier en fonction de la méthode de transfection choisie, du type de cellule et de la taille du plasmide ⁷⁰. De plus la culture ex vivo est plus longue qu'avec les vecteurs viraux pour générer des doses thérapeutiques. En conséquence, la plupart des chercheurs continue d'utiliser des vecteurs viraux pour fabriquer les CAR-T cells ^{71,74}.

2.2.3.3 Expression transitoire du CAR

Le transfert d'un ARNm (ARN messenger) assure l'expression transitoire du CAR, contrairement aux autres méthodes décrites précédemment ⁶⁶. L'ARNm transféré in vitro par électroporation ou par endocytose est lu directement par le ribosome qui synthétise le CAR. Cette approche a deux avantages. D'une part, elle n'intègre pas un génome à la cellule hôte et donc le risque d'oncogenèse y est absent. D'autre part, elle permet de contrôler la quantité de CAR-T cells présent au sein de l'individu. Les CAR-T cells ont une durée de vie d'une semaine⁶⁶. Le médecin peut différer les injections en fonction de la toxicité et de l'efficacité ⁶⁶.

2.2.4 Expansion cellulaire

Après avoir transféré le gène d'intérêt, il faut obtenir un pool suffisant de CAR-T cells. La phase d'expansion in vitro est effectuée par la stimulation des cellules T en utilisant des anticorps anti-CD3 avec ou sans co-stimulant supplémentaires (anticorps anti-CD28, IL-2, IL-7, IL-12). Des cellules présentatrices d'antigènes artificielles comme les cellules tumorales irradiées ou des cellules K562 transformées par le virus epstein-Barr sont également utilisées. L'expansion ex vivo en utilisant des CPA artificielles semble générer des nombres plus élevés de lymphocytes T, au détriment d'une plus longue période de culture. La culture peut aller de 10 jours à plusieurs semaines pour obtenir plusieurs centaines à plusieurs milliers de fois l'expansion cellulaire ⁶⁸.

La persistance in vivo étant directement corrélée avec la capacité de prolifération, il est important de générer des LT capables de proliférer. Deux méthodes sont employées pour accroître la prolifération in vivo. La première consiste à modifier le procédé de fabrication,

soit en raccourcissant la période ex vivo d'expansion de telle sorte que les cellules T soient moins différenciées, ou en utilisant des cytokines telles IL-7 et IL-15⁷⁶. La seconde approche est de partir avec un pool d'une sous population de lymphocyte T défini, par exemple la population de lymphocyte T CD4 ou CD8. Le produit résultant se compose donc d'une population uniforme⁷⁷. Il s'agit d'un concept mis à l'essai (NCT01865617)⁶⁸.

2.2.5 Formulation du produit fini

Les CAR-T cells représentent une approche nouvelle et prometteuse dans la thérapie du cancer. Contrairement aux médicaments oncologiques classiques où les relations dose-réponses sont facilement mesurables, les CAR-T cells préparées à partir de populations cellulaires non sélectionnées peuvent varier en puissance⁷⁸.

Nous avons vu que les lymphocytes T CD4 et CD8 humains comprennent des sous-populations fonctionnelles distinctes⁷⁹. Dans les essais cliniques de patients atteints de tumeurs malignes B, les données montrent une disparité des sous-populations de LT⁷⁸. Les sous-populations de LT collectés de chaque patient seront hétéroclites en absence de sélection. L'administration d'un tel produit de CAR-T cell hétérogène entre individu nuit à la reproductibilité des essais⁷⁸. Une composition uniforme du produit thérapeutique fournirait une activité reproductible en thérapie clinique et faciliterait la corrélation potentielle entre la dose cellulaire et l'efficacité ou avec la toxicité.

Certaines études précliniques étayent l'amélioration de l'efficacité et de la prévisibilité de l'efficacité thérapeutique en fabriquant des CAR-T anti-CD19 de sous-groupes CD4 et CD8 définis⁷⁹. La formulation de produits cellulaires dans un rapport CD4 / CD8 égal à un a abouti à l'éradication complète du lymphome B chez des souris Raji et chez des patients^{78,79}. Les doses étaient 5 à 100 fois plus faibles que celles utilisées pour traiter la majorité des patients dans d'autres essais⁷⁹. L'activité antitumorale est corrélée à la prolifération des cellules CAR-T CD4 et CD8⁷⁸.

D'autres patients n'ont reçu qu'une seule sous-population des CAR-T cell à partir de sous-ensembles de lymphocytes T distincts et la puissance est réduite par rapport à un produit avec les deux sous-populations⁷⁸.

La thérapie adoptive avec des produits cellulaires définis exigera des méthodes de sélection de cellules conformes aux bonnes pratiques de fabrication. Des progrès ont récemment été réalisés dans les méthodes de sélection de cellules (cytométrie de flux, sélection en série sur colonne avec réactifs de liaison réversible)⁸⁰. L'identification des compositions les plus efficaces des cellules CAR-T nécessitera une évaluation rigoureuse dans des essais cliniques. Elle sera plus critique dans les tumeurs solides que dans les hémopathies malignes⁷⁸. Le rapport CD4/CD8 est déterminant dans l'efficacité, la toxicité et la persistance de la thérapie selon le type de cancer⁷⁹.

2.3 La toxicité de CAR-T cell

Les CAR-T cells témoignent d'une incroyable efficacité. Elle s'est cependant accompagnée d'une toxicité allant jusqu'au décès de patients. Les effets indésirables sont de nature immédiate, retardée, légère ou sévère et persiste pendant toute la durée de vie des cellules perfusées. Cette persistance prolonge la toxicité bien au-delà des produits pharmaceutiques classiques²⁸. La toxicité liée à la perfusion CAR-T cell est généralement légère et réversible. Elle comprend la fièvre, des frissons, de l'hypotension, des dyspnées, des maux de tête, de la fatigue, et des altérations neurologiques. En revanche, la toxicité sévère se manifeste par le SRC (syndrome de libération des cytokines), effets hors cible et la toxicité neurologique².

La prévention ou la gestion de la toxicité sont apparues comme un élément clé dans l'application clinique de cette nouvelle technologie. Idéalement, la prédiction de la gravité et de l'apparition des effets indésirables permettrait d'envisager un traitement prophylactique pour s'en prémunir. Dans cette partie nous détaillerons la toxicité des CAR-T cells anti-CD19 qui fut l'une des premières thérapies à dépassé le stade préclinique (Tableau 5).

2.3.1 Toxicité

2.3.1.1 Le syndrome de relargage des cytokines

La toxicité la plus sévère et inattendue observée chez les patients a été le syndrome de relargage de cytokines. Le SRC se manifeste comme une réaction immunitaire rapide provoquée par la libération massive de cytokines, d'IFN- γ et IL-6 notamment. L'augmentation significative d'IL-6 est plus probablement due à un syndrome d'activation des macrophages. Le rôle pathogène de l'IL-6 a été étayé empiriquement par les effets positifs obtenus par l'administration de l'antagoniste du récepteur de l'IL-6, le tocilizumab⁸².

Les symptômes d'un SRC incluent l'hypotension, la fièvre, des complications neurologiques et la défaillance multiorganique (insuffisance rénale aigüe, insuffisance respiratoire, trouble de la coagulation)⁸¹. En dépit de ces effets indésirables, l'intensité de la toxicité du SRC a été corrélée avec l'efficacité anti tumorale du traitement dans les essais cliniques de CAR-T cell

anti-CD19 réalisés. Tous les patients ont donc présenté un SRC dont trente pourcents étaient qualifiés de sévère ⁸¹.

Au niveau biologique, les taux sériques d'IL -6, d'IFN- γ , de ferritine, de protéine C-réactive, de récepteur soluble IL-2, de D-dimères et de fibrinogène sont proportionnels à la gravité du syndrome. À l'heure actuelle, la plupart des SRC sont gérables avec des corticoïdes à haute dose, des vasopresseurs, une assistance ventilatoire. Cependant, l'utilisation prolongée de fortes doses de corticoïdes, supérieure à quatorze jours a également entraîné l'aplasie de la population des CAR-T cell ⁸¹. De plus, le tocilizumab permet une diminution significative des symptômes. La FDA autorise son utilisation en première intention dans le cadre d'un SRC ⁸³.

2.3.1.2 Toxicité neurologique

Environ 26-50% des patients traités ont manifesté une toxicité neurologique dont l'encéphalopathie, la confusion, le délire, les convulsions, les myoclonies, les tremblements, les troubles de la marche, la paralysie, l'apraxie, l'aphasie ou des hallucinations visuelles. Les symptômes miment d'une certaine façon les effets indésirables associés à l'anticorps anti-CD19, le blinatumomab ⁵⁷.

La présence de CAR-T cell anti-CD19 a été détectée dans le liquide céphalo-rachidien chez certains patients. Cependant aucune corrélation entre leur présence et la neurotoxicité n'a pu être conclue. De plus la sévérité des symptômes neurologiques n'a pas montré une corrélation avec la sévérité du SRC. La physiopathologie responsable de ces effets indésirables neurologiques demeure inconnue. Il est possible que les niveaux de cytokines élevés soient en partie responsables de séquelles neurologiques ⁵⁷.

À ce jour, la toxicité neurologique a été réversible dans la majorité des cas. Il n'existe pas de gestion standardisée. La dexaméthasone montre une efficacité intéressante ⁸³.

2.3.1.3 Effet hors cible

Tous les effets hors cible correspondent à l'activation du CAR-T cell en dehors de l'objectif thérapeutique. Par exemple, chez les patients traités par des CAR-T cell anti-CD19, une

aplasie des lymphocytes B a nécessité la perfusion d'immunoglobulines en prévention des risques infectieux dû à l'activation des CAR contre la lignée cellulaire B. L'expression de CD19 est uniquement liée aux lignées lymphoïdes B, il est peu probable d'avoir d'autres effets hors cible. Néanmoins, il reste à élucider si la déplétion des cellules B à long terme imitant la maladie de Burton (agammaglobulinémie lié au sexe) pourrait avoir d'autres conséquences chez les patients touchés ⁸¹.

La toxicité hors cible est classée en fonction de deux mécanismes différents (Figure 22) : la reconnaissance croisée des antigènes (ou off target) et l'activation indépendante de l'antigène ⁸².

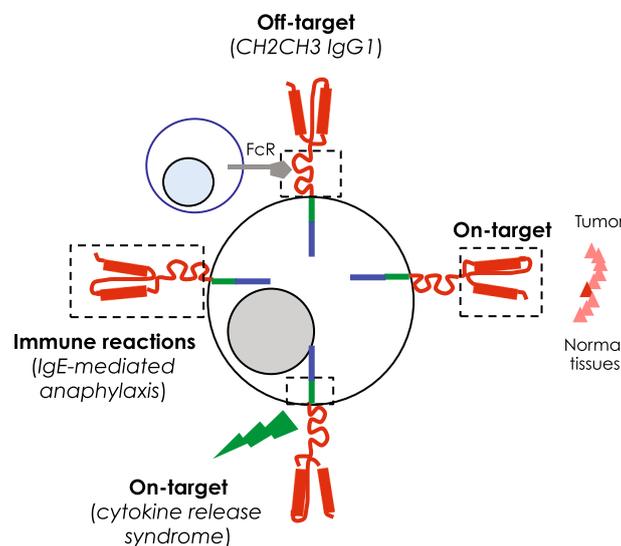


Figure 22 : La toxicité hors cible des CAR-T cells ⁸²

L'effet off-target ou hors-cible est celui le plus redouté. Il est lié au niveau d'expression de l'antigène sur les tissus sains. Dans le cas de l'expression de l'antigène cible par des tissus non essentiels, les événements indésirables peuvent être gérables. Les mêmes niveaux d'expression par les tissus essentiels sont potentiellement graves. Par exemple, la perfusion de CAR-T cell anti HER-2 (Human epidermal growth factor receptor 2) chez un patient atteint du cancer du côlon métastatique a entraîné une toxicité pulmonaire et la mort du patient en 4 jours. L'issue fatale était très probablement due à l'expression de HER-2 dans l'endothélium pulmonaire ⁸².

De plus, la probabilité de réactivité croisée est plus élevée pour un épitope court, plutôt que pour un long, puisque la probabilité que deux molécules distinctes se ressemblent est inversement proportionnelle à leur complexité. Ainsi il devient crucial d'effectuer une analyse détaillée de l'expression de l'antigène cible sur des tissus normaux et, parallèlement, de vérifier la sensibilité des cellules saines. A cet effet, les expériences *in vitro* peuvent ne pas être suffisantes, car l'antigène ciblé pourrait être exprimé à certains stades de différenciation, par exemple CD123⁸², ou pourrait être modulé par des signaux environnementaux, par exemple CD44v6⁸⁴.

L'activation indépendante de l'antigène est un mécanisme lié à la conception du récepteur. Les données *in vitro* suggèrent que les constructions synthétiques elles-mêmes peuvent présenter certains risques de reconnaissance hors cible. Par exemple, dans des essais *in vitro*, les CAR portant le domaine CH2CH3 dérivé de IgG1 comme charnière extracellulaire activent des cellules de l'immunité innée (macrophages, cellules NK) en interagissant avec leurs récepteurs Fc⁶³. Bien que le CAR-T cell conçu avec des régions d'espacement dérivées d'IgG1 aient été utilisées dans des essais cliniques sans effets toxiques, cette possibilité doit être gardée à l'esprit pour les développements futurs⁸².

2.3.1.4 Réaction immune : Anaphylaxie et maladie de l'hôte contre le greffon

La majorité des lymphocytes T génétiquement modifiés utilisés dans les essais cliniques se compose d'un scFv d'origine murin. Par conséquent, des manifestations immunitaires ont été démontrées en raison de l'immunogénicité de la protéine étrangère. Des efforts sont en cours pour humaniser les composants des protéines exprimées⁸¹. L'auto transfusion de cellules T permet d'éviter la maladie de l'hôte contre le greffon.

2.3.1.5 Oncogenèse insertionnelle

Au cours du processus de fabrication des CAR-T cells, l'insertion d'un transgène dans l'ADN comporte le risque de transformation maligne induite. Ainsi, le risque d'oncogenèse lié à l'insertion de matériel viral dans des cellules humaines a été établi dans le cadre d'une thérapie génique de cellules souches hématopoïétiques chez un patient atteint d'une immunodéficiência liée au chromosome X combinée sévère et chez un patient atteint de

granulomatose chronique ⁸¹. En dépit des risques de mutagenèse insertionnelle, il n'y a eu aucun rapport au cours des essais cliniques menés depuis dix ans avec plusieurs CAR-T cells ⁸¹. Cependant, les chercheurs doivent rester vigilants et contrôler strictement la conception des CAR-T cells ⁸¹.

2.3.2 Réduction de la toxicité des CAR-T cells

La gestion de la toxicité est devenue indispensable pour une application clinique à grande échelle. Le traitement symptomatique n'est pas une solution à long terme. Des modifications structurales doivent être apportées pour réduire la toxicité.

Deux axes de développement ont été privilégiés (Figure 23) : Soit un meilleur ciblage des cellules par l'expression de co-récepteurs. Soit par des systèmes d'élimination par la présence de gènes suicides, l'expression transitoire du CAR ou l'expression d'un récepteur tronqué.

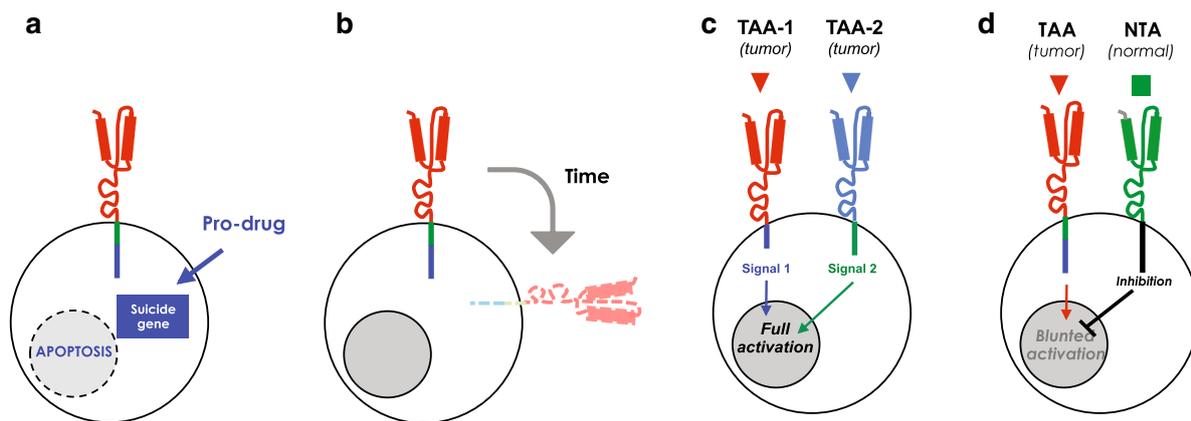


Figure 23 : Modification structurale de CAR-T cell pour réduire la toxicité ⁸².

A, le CAR-T cell est équipé de gènes suicidaires pour permettre leur élimination en cas de toxicité.

B, Le CAR-T cell est exprimé transitoirement par électroporation d'ARNm.

C, Le signal 1 d'activation (CD3 ζ) et le signal 2 de costimulation peuvent être scindés en deux CAR activés par différents antigènes coexprimés sur des cellules malignes, favorisant l'activation complète seulement à l'intérieur de la tumeur.

*D, le CAR-T cell est constitué d'un récepteur inhibiteur, portant un domaine intracellulaire de PD1 ou CTLA4, qui peut être déclenché par un antigène exprimé sur des cellules normales, ce qui permet l'inhibition des cellules T à l'extérieur de la tumeur*⁸².

2.3.2.1 Optimisation des liaisons antigène-récepteurs

Pour limiter l'effet hors cible, il est possible de jouer sur l'affinité ou la densité de l'épitope. Par exemple, les antigènes à haute affinité pour le CAR seraient éliminés préférentiellement alors que ceux à faible affinité exprimés sur les tissus sains ne seraient que peu impactés. La modification de la structure a été décrit dans le paragraphe (2.1.2.1 domaines extracellulaire)

2.3.2.2 Activation ciblée : double CAR et CAR inhibiteur

Un co-récepteur affine la précision de la reconnaissance. Pour lutter contre l'effet off target, les chercheurs miment le vivant par l'expression d'un co-récepteur stimulateur ou inhibiteur.

L'une des stratégies est de construire un CAR avec une double reconnaissance. Les domaines de signalisation sont scindés en deux récepteurs ciblant chacun un Ag (Figure 23 C)^{61,82,85}. Le domaine CD3 ζ assure l'une des signalisations et le domaine CD28 ou 4-1BB l'autre. Seule la reconnaissance des deux antigènes assure un signal suffisant pour détruire la cellule cible et ainsi réduire la toxicité liée à l'effet off target.

Dans la seconde stratégie, la reconnaissance de l'antigène conduit à un signal inhibiteur. La cellule T est construite avec deux récepteurs, l'un ciblant la tumeur, l'autre inhibiteur ciblant les cellules saines (Figure 23 D)⁸⁶. L'effet inhibiteur est dominant et réversible, médié par la signalisation intracellulaire de récepteurs physiologiques tels que PD1 et CTLA4⁸². Ainsi le tissu sain est préservé de la toxicité⁶¹.

2.3.2.3 Expression transitoire d'un récepteur d'antigène chimérique

Pour moduler la toxicité, la durée de l'expression du CAR peut être une voie exploitée en utilisant l'électroporation d'ARNm (Figure 23 b)⁸². Un essai a démontré la faisabilité avec des

CAR-T cells anti mésothéline ⁸⁷. La mésothéline est un antigène exprimé au niveau pleural, péricardiaque et surexprimé dans le cancer pancréatique et ovarien. Les deux patients traités avec des perfusions multiples CAR-T cell anti mésothéline ont présenté des signes d'activité anti tumorale, sans signes de toxicité hors cibles (pleurite, péricardite ou péritonite) ⁸⁷. Cette méthode peut être utilisée comme moyen pour réduire la toxicité.

2.3.2.4 Gène suicide

Les gènes suicide sont des commutateurs génétiques capables de favoriser l'élimination sélective des cellules exprimant le dit gène lors de l'administration d'un précurseur ⁸⁸. L'utilisation de gènes suicidaires pour contrôler les toxicités des CAR-T cell a été mise au point dans le contexte de la transplantation de cellules souches hématopoïétiques, où les cellules T donneuses alloréactives peuvent être éliminées sur demande pour sauver les patients de la GVHD (maladie du greffon contre l'hôte) ⁸² (Figure 23 a).

2.3.2.4.1 Gène thymidine kinase

Le premier gène suicide évalué chez l'homme est le gène de la TK (thymidine kinase) du virus de l'herpès simplex ⁸¹. Après transfère du gène, la TK catalyse la réaction de phosphorylation du ganciclovir pour qu'il soit actif. Une fois actif, il diminue la production désoxyribonucléotide et inhibe l'ADN polymérase. Ainsi, la prise de ganciclovir permet une élimination des CAR-T cells. Bien qu'elle soit efficace, cette approche est limitée par l'immunogénicité du gène TK issus de l'herpès simplex ainsi que de la toxicité notamment rénale du ganciclovir. D'autre part, le recours à l'inhibition de la réplication de l'ADN en tant que méthode de la mort cellulaire peut retarder son élimination ⁸¹.

Les chercheurs se sont alors tournés vers d'autres méthodes moins toxiques et plus spécifiques.

2.3.2.4.2 Caspase 9 inductible

Un autre gène suicide code pour une forme inductible iCas9 (caspase 9 inductible), une molécule proapoptotique tardive. Cette molécule est une caspase 9 dépourvue de son domaine de recrutement et fusionnée à un peptide muté FKBP12 pour former deux monomères

inactifs. L'interaction du domaine de FKBP12 avec une petite molécule, AP1903, induit la dimérisation et donc l'activation de la caspase 9 (Figure 24). Il s'en suit l'apoptose de la cellule ⁵⁶

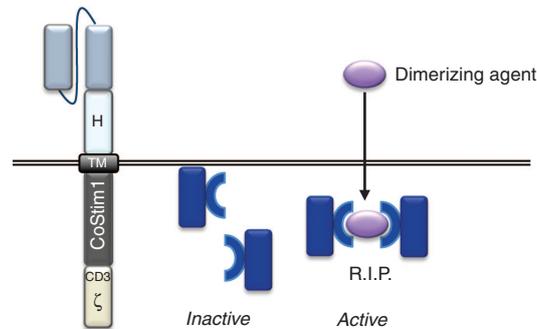


Figure 24 : Schéma de CAR-T cells muni du système icas9 ⁵⁶

La cinétique d'élimination de CAR-T cell est rapide, quelques heures après l'administration de AP1903 ⁸². Cette méthode pourrait tout aussi bien être utilisée lors d'une toxicité précoce comme tardive. Des essais cliniques sont en cours avec des CAR-T cell de troisième génération avec iCas9 chez des patients atteints de neuroblastome ⁸².

2.3.2.5 Récepteur tronqué

Une autre approche implique l'expression d'un récepteur tronqué dépourvu du domaine de signalisation intracellulaire ciblé par un anticorps provoquant l'épuisement des cellules ⁵⁶. Les CAR-T cells exprime des antigène connus tel que EGFR (Epidermal growth factor receptor) ⁸⁹ ou CD20 ⁹⁰. L'injection de rituximab pour le premier et de cetuximab pour le second occasionnent l'élimination des CAR-T cells ^{89,90,91}.

Cette méthode permet également la sélection ex vivo et le suivi in vivo des populations de CAR-T cell. Les facteurs limitant cette méthodologie sont les effets sur la cible secondaire inhérents à la liaison des anticorps aux tissus normaux, ainsi que la clairance du complexe immun qui fait parfois défaut chez les patients ⁸¹.

2.4 Devenir in vivo de CAR-T Cells

Les notions pharmacocinétiques d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'élimination se comportent différemment en raison de la nature « vivante » du médicament. Lors de la perfusion chez un patient, les CAR-T cells doivent se diriger vers le site de la tumeur, s'approprier avec leur antigène, proliférer, éviter les signaux inhibiteurs du microenvironnement, tuer les cellules cibles et persister suffisamment longtemps pour s'assurer qu'aucune cellule tumorale résiduelle ne se forme. Toutes ces étapes sont d'autant plus obstacle au modèle classique de pharmacocinétique.

2.4.1 Dosage et administration

La perfusion par voie intraveineuse ne restreint pas l'absorption, mais des schémas de prise doivent être trouvés pour réduire la toxicité. La dose optimale à injecter est délicate à trouver pour plusieurs raisons : premièrement, les CAR-T cells sont des « médicaments vivants » qui subissent des régulations dynamiques qui ne sont que partiellement connues. Deuxièmement, la variation inter-individuelle du produit entraîne des différences importantes en termes de qualité et de quantité. Troisièmement, plusieurs rapports indiquent qu'il n'existe aucune corrélation entre le nombre de CAR-T cells transfusés et les résultats cliniques⁵⁷. Jusqu'à présent, la stratégie d'administration a consisté en un séquençage de la dose sur plusieurs jours afin de diminuer le risque de toxicité : 30% du dosage au jour 1 et 70% le jour 2, ou l'injection de 10%, 30% et 60% de la dose sur trois jours⁹².

2.4.2 Distribution des CAR-T cells

Après la perfusion intraveineuse, les CAR-T cells se distribuent rapidement du sang vers les poumons, le foie et la rate^{93,94}. Après quelques jours, leur nombre augmente sensiblement dans le sang grâce à la prolifération cellulaire⁶⁸.

L'accessibilité du médicament à la tumeur est un facteur limitant la distribution. La modification du flux sanguin et de l'endothélium dans une masse tumorale empêche l'adhérence et l'infiltration des lymphocytes T⁹⁵. Par conséquent, les meilleurs résultats cliniques ont été obtenus dans les cancers hématologiques où l'accès est plus aisé⁹⁶. La

migration comprend une séquence complexe d'événements qui commencent par l'adhésion des CAR-T cells aux cellules endothéliales suivie de l'extravasation entraînée par des chimiokines ou les intégrines. Les tumeurs expriment une variété de chimiokines que les LT n'expriment pas toujours. En effet, ils peuvent ne pas disposer du récepteur approprié pour interagir avec ces chimiokines. C'est pourquoi certains modèles CAR expriment des récepteurs de chimiokines pour augmenter la distribution ^{48,64}. L'expression d'intégrines ou VEGFR (Vascular endothelial growth factor receptor) peut aussi faire l'objet de recherches pour améliorer l'extravasation ^{48,97}. Le VEGFR est exprimé dans de nombreuses tumeurs où la néoangiogenèse est importante.

L'expression de récepteur pour augmenter la distribution des CAR-T cell n'est pas la seule méthode efficace. L'administration au niveau de la tumeur améliore l'activité du traitement selon de récents résultats in vivo ⁹⁸. Un implant bio-polymère a été développé pour fournir une délivrance localisée en combinaison avec des cytokines afin d'améliorer la prolifération des lymphocytes T ⁸⁵.

2.4.3 Améliorer in vivo la persistance à long terme

Les cellules CAR-T meurent en raison de l'absence de facteurs de survie ou par hyperactivation, elles sont retirées de la circulation par le système réticulo-endothélial de la rate et du foie par des mécanismes encore mal élucidés ⁶⁴. La clairance des cellules injectées détermine la persistance de l'efficacité. En dépit de l'injection de plusieurs milliards de CAR-T cells, la persistance in vivo est souvent limitée à quelques jours ⁴⁸. Plusieurs modèles sont à l'étude dont la résistance à l'apoptose, le choix de la population de LT transfusée et le conditionnement pour augmenter la survie cellulaire.

2.4.3.1 Résistance à l'apoptose

Le fer de lance de la persistance des CAR-T cell est la résistance à l'apoptose⁴⁸. Le message d'apoptose est souvent médié par le microenvironnement ou la surexpression des voies inhibitrices ⁴⁸. L'utilisation d'un domaine de co-stimulation confère aux cellules une certaine résistance à l'apoptose in vivo comme in vitro ⁴⁸. Cependant, la meilleure stratégie adoptée est

la lutte contre les voies inhibitrices soit par l'inhibition des voies apoptotiques, soit par la répression des récepteurs inhibiteurs.

De nombreuses cellules expriment le FasL dans l'environnement immunosuppresseur⁹⁹. C'est l'une des principales voies d'apoptose. Ainsi le transfert d'un ARN interférant limite la synthèse du récepteur Fas. La liaison entre FasL et Fas n'a pas lieu. D'autres gènes codant pour des molécules anti-apoptiques Bcl-xL est également étudié pour inhiber la synthèse de molécule apoptotique^{100,101}.

Une façon originale de détourner l'action immunosuppressive du microenvironnement est de fusionner la partie extracellulaire inhibitrice de CTLA4 avec un domaine intracellulaire stimulateur de CD28. Le récepteur CTLA4 ligature normalement CD80 et CD86 sur les CPA et conduit normalement à l'apoptose ou à l'anergie. Or la fusion de CTLA4 avec le domaine CD28 mène à un signal stimulateur¹⁰². Donc le signal immunosuppressif de l'environnement devient stimulateur, le CAR-T cell survie et prolifère.

2.4.3.2 Rôle de la différenciation et du phénotype mémoire

Idéalement, les CAR-T cells devraient adopter préférentiellement un phénotype mémoire pour persister et survivre⁶⁴. Donc, l'état de différenciation des cellules à la fin de la période de culture joue un rôle important dans l'efficacité à long terme du traitement. La différenciation du phénotype mémoire est réalisée par les stimulations antigéniques successives. D'abord, le lymphocyte naïf se différencie en lymphocyte mémoire souche puis en lymphocyte mémoire central et enfin en lymphocyte effecteur mémoire¹⁰³. Actuellement, la manipulation de LT induit une différenciation progressive en LT_{EM}¹⁰⁴. Or, les LT_{MC} ont une durée de vie plus longue et donc une meilleure efficacité¹⁰⁵. De plus, l'analyse rétrospective de plusieurs essais cliniques a démontré le lien entre la persistance à long terme de CAR-T cells in vivo et la proportion de LT_{MC} dans le produit injecté¹⁰⁶. L'incapacité à produire de l'IL-2, la diminution de l'expression des récepteurs aux cytokines et l'équilibre entre les molécules pro-apoptotiques et anti-apoptotiques expliqueraient la persistance de ce phénotype de lymphocyte.

De nombreux éléments restent à définir, comme le pourcentage de LT_{MC} dans le produit et la technologie utilisée pour induire ce phénotype. Les nouveaux protocoles de manipulation devront prendre en compte ces connaissances afin d'améliorer la persistance du médicament *in vivo* ⁶⁴.

2.4.3.3 Rôle du conditionnement, la lymphodéplétion

Le conditionnement avant l'injection de LT autologues est une pratique connue depuis des décennies. Dans un essai clinique du mélanome métastatique, le conditionnement avec fludarabine et cyclophosphamide avant le transfert adoptif de TIL a entraîné un taux de réponse de 50% et une persistance à long terme ¹⁰⁷. D'autres études précliniques et cliniques démontrent clairement que la prolifération et la persistance des CAR-T cell sont augmentés par lymphodéplétion. La lymphodéplétion est généralement obtenu par chimiothérapie et/ou radiothérapie ¹⁰⁸.

Les résultats expérimentaux ont par la suite apporté un éclairage sur le mécanisme par lequel la lymphodéplétion augmente l'activité anti-tumorale des LT. L'effet bénéfique du conditionnement est dû à trois mécanismes ⁵⁷: tout d'abord la réduction du nombre de cellules au sein de la tumeur qui crée de l'espace pour les cellules injectées. Ensuite, le conditionnement réduit le nombre de LT dont les LTreg. La sécrétion de cytokine pro-tumorale est alors moins importante, ce qui permet la survie des CAR-T cells. Enfin, l'apoptose lymphoïde qui stimule les cellules stromales à produire des cytokines IL-7 et IL-15 ^{109,110}. Ces dernières sont associées à une expansion accrue des cellules injectées et favorisent le phénotype LT_{MC} ¹¹¹.

Dans la plupart des essais cellulaires CAR-T, la lymphodéplétion est donc aujourd'hui réalisée en standard pour assurer la prise de greffes fonctionnelles des cellules T génétiquement modifiées ^{57,64}. Dans les leucémies aiguës lymphoïdes, le conditionnement implique le cyclophosphamide soit seul soit associé avec de la fludarabine, ces deux méthodes produisant des résultats similaires ^{57,112}. Chez les patients atteints de leucémie lymphoïde chronique, le conditionnement de la bendamustine avec le cyclophosphamide a donné de meilleurs résultats que le cyclophosphamide seul ¹¹². Alors que dans le lymphome non hodgkinien, un

conditionnement combinant le cyclophosphamide avec la fludarabine a conduit à de meilleurs résultats ¹¹².

2.5 Nouveaux modèles de CAR

Les traitements actuels avec les lymphocytes T, bien que prometteur partagent tous une conception similaire qui déclenche les mêmes voies de signalisation en réponse à un antigène cible unique. Dans ce paragraphe, nous examinons les nouveaux modèles en cours d'études qui élargissent les champs d'activités, améliorent la spécificité ou module l'activité ⁸⁵.

2.5.1 CAR universel

Un CAR-T cell cible un TAA uniquement. Lors de résistance au traitement, le CAR-T cell doit être entièrement éliminé et injecter un autre CAR-T cell ciblant le nouveau TAA. Le CAR universel lève ce frein. Il existe différentes conceptions de CAR universel mais le principe reste commun ^{54,85}. La partie extracellulaire ne reconnaît plus un TAA mais une partie constante d'un anticorps qui est injecté. La partie extracellulaire peut être le récepteur CD16 ¹¹³ ou bien un récepteur de l'isothiocyanate de fluorescéine ou de biotine ^{114,115}. L'avantage de cette thérapie est la flexibilité d'utilisation et permet d'élargir son champ d'application. Le but est de combiner l'injection de CAR-T cell à des anticorps pour cibler le TAA souhaité. Les Anticorps ciblent simultanément ou séquentiellement des TAA afin d'avoir une meilleure efficacité et de compenser les phénomènes de résistance.

Des études sur les animaux ont validés ce modèle ^{114,115}. Des essais cliniques sur des patients doivent le confirmer ⁵⁶.

2.5.2 Banque de CAR-T cell

La technique actuelle utilise des lymphocytes T autologues pour éviter tout risque de maladie du greffon contre l'hôte ou de rejet. En effet le TCR allogénique du donneur reconnaît les cellules de l'hôte comme du non-soi et les détruit ¹¹⁶. Les cellules du receveur perçoivent les cellules allogéniques comme du non soi via le CMH-I ¹¹⁷. L'utilisation d'une banque de CAR-T cell permettrait une application à grande échelle et une réduction des coûts⁶.

Les donneurs sains fournissent des LT pour constituer une banque de cellules T « off the shelf » c'est à dire non immunologique. Pour élaborer une telle banque, il faut modifier l'expression du TCR endogène et du CMH-I des cellules du donneur (Figure 25) ⁸⁵. Il existe

plusieurs outils de modifications génétiques comme la nucléase à doigts de zinc, le TALEN (Transcription activator-like effector nuclease) ou encore CRISPR Cas9^{85,116,117}. Cette technique doit encore être testée et validée.

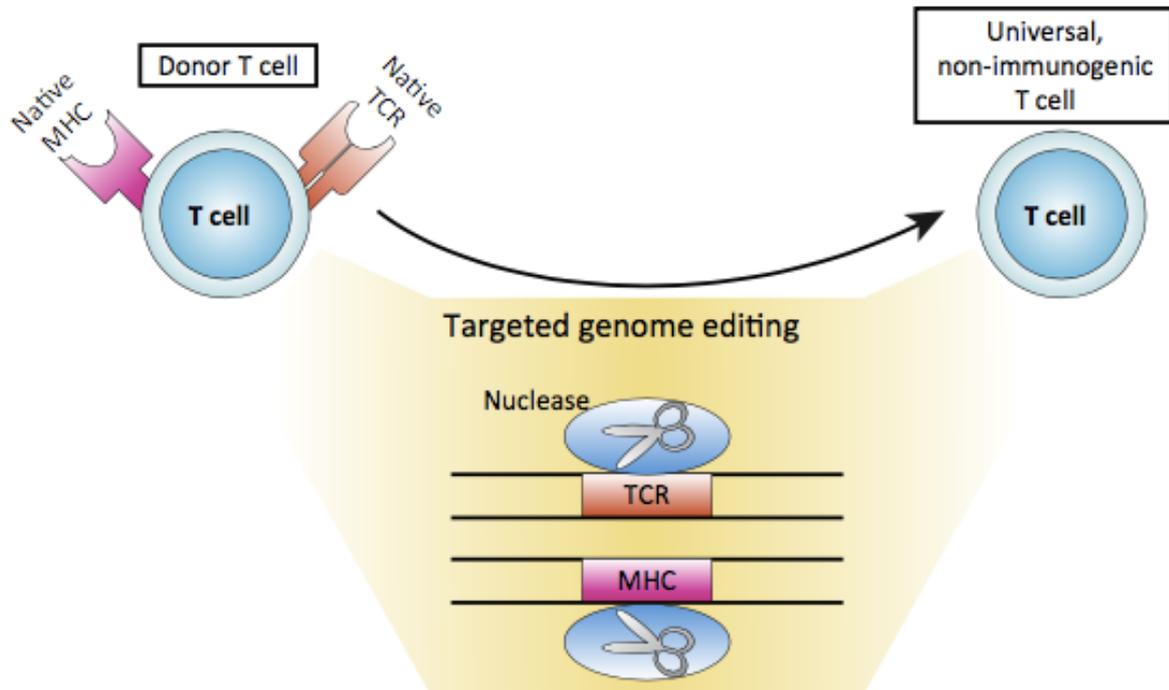


Figure 25 : CAR-T cell non immunogénique⁸⁵

2.5.3 T cells Redirected for Universal Cytokine Killing

Les lymphocytes possèdent une activité cytolytique via le TCR mais également une fonction auxiliaire par la sécrétion de cytokines. Dans ce modèle innovant, le CAR possède deux activités, une cytolytique et une sécrétrice de cytokines⁵⁵. Il est souvent comparé à la quatrième génération de CAR. Le but est d'induire à nouveau une réaction immunitaire anti tumorale dans le microenvironnement notamment dans les tumeurs solides¹¹⁸.

Le TRUCK (T cells Redirected for Universal Cytokine Killing) conçu avec un gène d'IL 12 permet une sécrétion constitutive ou inductible de cytokines^{119,120}. L'IL-12 a des effets anti tumoral et stimule les TRUCK créant une boucle d'auto induction. Le domaine CD3 ζ recrute le promoteur NFAT (facteur nucléaire des lymphocytes T activés) permettant une expression inductible et contrôlée du gène d'IL-12 afin d'éviter une surproduction de cytokines¹¹².

Lors d'un essai pré-clinique, la dose injecté de TRUCK était 10 fois moins importante qu'avec

une injection de CAR-T cell sans le gène IL-12¹²¹. Cette stratégie peut être étendue à d'autres cytokines anti-tumorales.

2.5.4 Autres conceptions de CAR-T cell

D'autres conceptions de CAR-T cell sont à l'étude. Le CAR dit blindé est conçu pour résister à l'immunosuppression présente dans le microenvironnement. Il perd l'expression de diverses molécules de point de contrôle immunitaire par exemple CTLA4 ou PD1. Il peut être administré avec un anticorps monoclonal qui bloque la signalisation immunitaire de contrôle^{6,55,56}. Ce modèle de CAR se rapproche de celui de TRUCK. La conception a pour but d'améliorer la survie des LT, de perturber et de moduler favorablement le microenvironnement tumoral¹²².

La migration des CAR-T cell vers sa cible peut également être améliorée. Ce modèle CAR co-exprime un récepteur de chimiokine qui se lie à un ligand de la tumeur par exemple, CCR2 (C-C récepteur motif chimiokine 2)⁶ ou CXCR2⁸⁵. L'amélioration du homing est particulièrement intéressante pour les tumeurs solides difficilement atteignables^{6,56}.

2.6 Le CAR exprimé chez d'autres types cellulaires

La plupart des études sur le CAR s'est concentrée sur les lymphocytes T avec un TCR à chaîne $\alpha\beta$. Cependant, d'autres lignées lymphoïdes comme les NK, les lymphocytes à TCR $\gamma\delta$ ou les progéniteurs lymphoïdes sont susceptibles d'être avantageux et sont actuellement à l'examen^{64,123}.

2.6.1 Lymphocyte T à TCR $\gamma\delta$

Les Lt $\gamma\delta$ représentent une petite sous-population des lymphocytes T circulants. Leur activité anti-tumorale puissante et leurs tropismes épithéliaux sont des atouts pour l'immunothérapie adoptive. Des études sont en cours sur les carcinomes rénaux, le cancer colorectal et certaines hémopathies malignes¹²⁴. Des essais précliniques chez des souris leucémiques CD19 xénogreffées ont montré l'efficacité des cellules T à TCR $\gamma\delta$ à CAR anti-CD19¹²⁵. D'après des études in vitro, CAR-T $\gamma\delta$ cells seraient de puissants et spécifiques effecteurs grâce à leur action cytolytique et leur sécrétion de cytokines, dont l'IFN- γ ¹²⁶. Cependant, l'utilisation des LT est limitée à la sous-population exprimant le TCR V γ 9V δ 2 du fait de l'absence de réactif d'expansion intéressant, à l'exception des aminobisphosphonates, favorisant ce sous-ensemble¹²⁵.

2.6.2 Cellule NK

Les cellules NK peuvent également faire d'excellentes candidates. Ces cellules sont associées à l'immunité innée du fait de leur action cytolytique non spécifique. Elles sont prélevées de plusieurs individus puis modifiées génétiquement¹²³ et perfusées chez les patients sans leur faire encourir les réactions immunologiques indésirables causées par l'alloréactivité³⁰. Par ailleurs, des essais cliniques avec des cellules NK adoptivement allogéniques transférées ont démontré que ces cellules peuvent survivre in vivo pendant plusieurs semaines à plusieurs mois¹²⁷. La partie intracellulaire DAP 12 serait plus efficace que la chaîne CD3 ζ ⁶⁴. Des essais de grande ampleur devront être réalisés.

2.6.3 Les progéniteurs lymphoïdes

Les progéniteurs lymphoïdes se différencient en précurseurs puis, au cours de leur différenciation, ils subissent une sélection positive puis négative pour aboutir à des LT naïfs. Les progéniteurs n'ont pas la capacité d'induire GVHD car ils sont insuffisamment différenciés. C'est pourquoi une modification génétique de progéniteurs lymphoïdes donnera un CAR efficace et sans GVHD ¹²⁸. Chez la souris, cette thérapie fonctionne avec des cellules autologues ou non ¹²⁹.

2.7 Donnée clinique

Le premier essai clinique attribué à la thérapie de CAR-T cell a été publié en 2008. Un CAR-T cell de première génération anti-GD2 (disialoganglioside de type 2) a induit une rémission complète chez trois enfants atteints de neuroblastome ¹³⁰. Depuis, cette approche thérapeutique a suscité un intérêt considérable et de vastes études précliniques et cliniques ont été réalisées avec divers antigènes cibles (Figure 26). Néanmoins, le traitement des tumeurs solides est plus difficile que celui des hémopathies malignes ¹³¹.

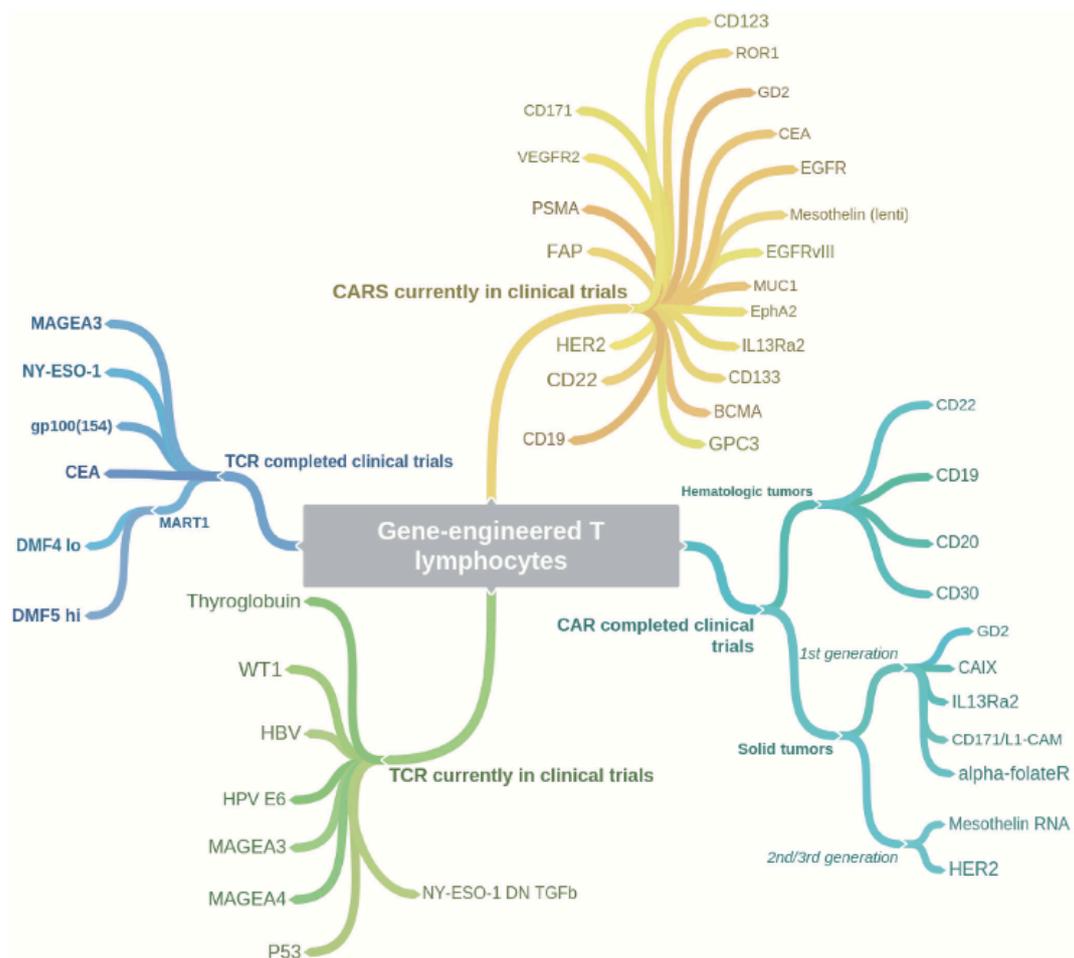


Figure 26: Les antigènes utilisés dans la thérapie adoptive à base de lymphocyte T ¹³⁰

À ce jour, les essais cliniques utilisant les CAR-T cell anti-CD19 de deuxième génération pour traiter les tumeurs malignes hématologiques sont ceux qui ont donné lieu aux réponses cliniques les plus encourageantes ¹³¹. Par ailleurs, kymriah® (tisagenlecleucel-T), un CAR-T cell anti-CD19 conçu par Novartis a reçu l'autorisation de mise sur le marché de la FDA en

juillet 2017. Le kymriah est indiqué dans le traitement des leucémie aigues lymphoïdes B chez l'adultes ou l'enfant de moins de 25 ans réfractaire ou en rechute.

2.7.1 Hémopathie maligne

Comme nous l'avons vu précédemment, la thérapie de CAR-T cible spécifiquement un antigène. Néanmoins, la plupart des antigènes sont exprimés dans les cellules tumorales comme saines. Par conséquent, la sélection des antigènes tumoraux nécessite de prendre en compte la toxicité hors cible. La sélection d'une cible appropriée est une étape essentielle dans le maniement de la thérapie. De plus, les hémopathies malignes sont faciles d'accès pour les CAR-T cells, ce qui réduit la nécessité pour les cellules thérapeutiques de circuler vers le site de la tumeur.

L'antigène CD19 est une glycoprotéine transmembranaire spécifique à la lignée lymphoïde B de 95 kDa ¹¹². Il module l'activation du BCR ¹³². Le CD19 est exprimé à tous les stades de la différenciation des cellules B et est conservé sur les cellules qui ont entrepris une transformation tumorale ¹³³. Il est présent sur une variété de maladies des cellules B, dans les leucémies lymphoïdes aiguës (LLA) ou chroniques (LLC), les lymphomes non hodgkiniens (LNH), certains lymphomes hodgkiniens (LH) ou les myélomes multiples (MM) ¹¹². C'est l'antigène cible le plus étudié dans les thérapies de CAR-T cells. L'effet hors-cible qui en découle est une lymphodéplétion de LB. Elle est traitée par transfusion de gamma-globuline ¹¹².

Dans les années 2010, les premiers essais cliniques ont été mis en place. La comparaison de ces essais est difficile car plusieurs différences existent dans les modèles d'essais (la sélection des patients, la chimiothérapie de pré-conditionnement et la conception du CAR) ⁵⁵.

2.7.1.1 CAR-T cell anti-CD19 et leucémie lymphoïde aigue à cellule B

En 2010, les premières études ont été menées sur la LLA-B. Les chercheurs du MSKCC (Memorial Sloan Kettering Cancer center) de New York ont publié des résultats en utilisant un CAR de deuxième génération CD19 (CD28-CD3 ζ) chez des adultes atteints de LLA-B réfractaires ou en rechute (NCT01044069) ¹³⁴. lors des résultats initiaux, une rémission

complète est constatée chez les patients traités ¹³⁵. Dans une mise à jour de cette étude, le taux de réponse complète est de 91% chez 32 patients évaluables ⁵⁵. Les toxicités signalées comprenaient l'aplasie transitoire des LB, le syndrome de libération des cytokines et les toxicités neurologiques ⁵⁵.

En 2012, les chercheurs de l'Université de Pennsylvanie et ceux du Children's Hospital de Philadelphie ont utilisé un CAR anti-CD19 de seconde génération (4-1BB-CD3ζ) pour traiter des patients adultes ou pédiatriques (NCT01626495) ⁵⁵. Les 30 patients pédiatriques et adultes avaient un taux de réponse de 90%, tous présentant un SRC ¹³⁶.

Depuis, plusieurs dizaines d'essais cliniques n'ont cessé de démontrer l'efficacité des CAR anti-CD19 dans le traitement des LLA-B.

2.7.1.2 CAR-T cell anti-CD19 et leucémie lymphoïde chronique

Certaines des premières études ont été réalisées à l'université de Pennsylvanie avec des CAR-T cells de deuxième génération (4-1BB-CD3ζ) pour traiter trois patients. Après transfusion autologue du produit, une rémission complète a été constatée chez deux patients, la troisième a quant à elle présenté une rémission partielle pendant plus de 8 mois ⁵⁷.

Dans l'essai mené par l'université de Pennsylvanie, aucune corrélation significative n'a pu être prouvée entre la réponse clinique et l'âge du patient, le sexe, le nombre de traitements antérieurs, le stade de la maladie, l'activité in vitro ou la dose de CAR-T cells transfusée. Toutefois, l'expansion, la persistance des CAR-T cells et la lymphodéplétion B sont corrélées avec les résultats cliniques ⁵⁷. L'activité des CAR-T cells a pu être détectée au-delà de quatre ans ¹³⁶.

De nos jours, sur huit essais de CAR-T cells anti-CD19 avec 46 patients atteints de LLC, des réponses ont été observées chez la moitié d'entre eux, avec une rémission complète pour douze d'entre eux ⁵⁷.

2.7.1.3 CAR-T cell anti-CD19 et le lymphome

Le *National cancer institute* a mené la majorité des études ciblant le lymphome jusqu'ici. Le CAR-T cell anti-CD19 de seconde génération exploite CD28 comme domaine de co-stimulation ⁵⁷. En 2010, la perfusion du traitement provoque chez un patient pré-traité par

cyclophosphamide et fludarabine une rémission partielle de trente-six semaines ¹³⁷. Avec le même protocole, trois autres patients ont été traités en 2012. Un patient est mort de la grippe, les deux autres ont obtenu une rémission stable durant douze mois ¹³⁸.

À ce jour, huit essais cliniques impliquant 43 patients ont été publiés. Ils démontrent une réponse chez 17 patients, dont 8 en rémission complète ⁵⁷.

Au MSKCC, des patients atteints de LNH agressifs à cellules B dans le contexte de transplantations autologues de cellules souches hématopoïétiques ont été traités avec des CAR-T cells anti-CD19 de seconde génération CD28-CD3 ζ (NCT01840566). Cinq des huit patients ont développé une réponse complète ¹³⁹.

2.7.1.4 CAR-T cell anti-CD19 et myélome multiple

Le myélome multiple correspond au développement anarchique de plasmocytes considérés comme CD19 négatifs. En 2015, Alfred Garfall et Edward Stadtmauer de l'université de Pennsylvanie ont réalisé un essai clinique (NCT02135406) ⁵⁵. Le CAR-T cell est alors composé du domaine 4-1BB et CD3 ζ ¹⁴⁰. Dans le cadre d'une auto-greffe, la patiente a reçu une chimiothérapie myéloablative, melphalan et cyclophosphamide suivi de CAR-T cells. Les premiers résultats ont décrit une rémission complète de la patiente un an après le traitement ¹⁴⁰. Les résultats furent d'autant plus étonnants que le myélome de la patiente était CD19 positive à 0,05%. Le groupe de travail émet alors l'hypothèse que les cellules souches cancéreuses forment un pool de cellules pro-tumorales ciblé par le CAR-T cell anti-CD19 ^{141,142,143}. La seconde phase de l'étude a révélé que quatre des dix patients traités montraient une réponse partielle de 35 à 222 jours au moment de la publication ¹⁴⁰.

2.7.1.5 Autres cibles des CAR-T cells dans les hémopathies

D'autres antigènes ont également été utilisés avec succès pour traiter les hémopathies malignes, résumé dans le Tableau 6 ⁵⁵.

2.7.2 Kymriah®

Le kymriah® est un CAR-T cell anti-CD19 de seconde génération avec le domaine de costimulation 4-1BB¹⁴⁴. Novartis s'est basé sur l'étude ELIANA (NCT02435849) pour démontrer l'efficacité de son nouveau médicament. Il a été évalué avec 63 patients sur les 68 initiaux, 4 étant décédés d'un SRC. Le kymriah démontre alors un taux global de rémission de 83% à trois mois. Cependant le traitement n'est pas dénué d'effets indésirables : chez 44% d'entre eux, ils ont manifesté une SRC de grade 3 ou 4, 18% des patients ont présenté des neuropathies de grade 3 ou 4 (encéphalopathie, céphalée, délire, anxiété). La fréquence hypogammaglobulonémie, hypotension, diminution de l'appétit, nausée vomissement est supérieur à 20%¹⁴⁴. La FDA a autorisé l'utilisation de tolicizulab (Actmenra®) comme outil contre le SRC. De plus, le coût de la thérapie est évaluée à 400 milles dollars. Novartis s'est engagé à ne facturer la cure que si les effets sont visibles à un mois de traitement.

Novartis déposera des demandes d'autorisation de mise sur le marché à l'agence européenne du médicament courant 2018 et aux autres agences. Le Kymriah est le premier d'une longue série de CAR-T cell.

2.7.3 Les tumeurs solides

Aux vues des résultats spectaculaires de la thérapie cellulaire adaptative de CAR-T cells dans le traitement des hémopathies malignes à cellule B, les tumeurs solides étaient l'étape suivante logique. Cependant, la grande majorité des essais précliniques ou cliniques sont décevants. L'essai d'un CAR de troisième génération anti-HER2 réalisé en 2010 pour traiter le mélanome métastatique fût dramatique. En effet, le patient est décédé en 5 jours à cause de l'effet hors-cible. La présence de l'antigène HER2 sur l'épithélium pulmonaire fut à l'origine de graves dommages responsables de la mort du patient¹⁴⁵.

2.7.3.1 Les obstacles à une *thérapie de CAR-T cell* efficace

Le traitement des tumeurs solides avec les cellules CAR-T fut limité par la structure histologique de la tumeur et un environnement immunosuppresseur¹³¹. Tout d'abord, la migration des CAR-T cells est limitée par la structure du tissu tumoral. Ensuite, les TAA

potentielles ne sont pas spécifiques de la tumeur mais se retrouvent également sur les tissus sains ¹³¹. Pour finir, le microenvironnement exerce une pression inhibitrice.

2.7.3.1.1 Faible infiltration des CAR-T cells au niveau tumoral

La migration des LT vers la tumeur mêle le roulement, l'adhésion, l'extravasation et le chimiotactisme. La structure tumorale et son micro-environnement entravent l'infiltration des LT ^{146,147,148}. Cette étape est essentielle pour le succès de la thérapie de CAR-T cell. La compréhension des phénomènes concernés améliorerait l'efficacité.

Ainsi, l'absence des récepteurs de chimiokines à la surface des CAR-T cells limite l'accès aux tumeurs ¹⁴⁹. Nous avons précédemment décrit la manière dont certaines conceptions de CAR-T cells sont réalisées avec des récepteurs aux chimiokines pour augmenter leur migration.

Le choix du site d'injection des LT en fonction du cancer est une approche envisageable pour optimiser la thérapie. Par exemple, l'injection intracérébrale des cellules CAR-T a permis d'éviter le phénomène de barrière hémato-encéphalique dans le traitement du glioblastome ⁹⁸. De même, une étude menée sur les cancers pleuraux a mis en évidence la différence d'efficacité entre deux voies d'administration (intraveineuse et intra-pleurale). L'administration intra-pleurale de CAR-T cells ciblant la mésothéline a permis une expansion et une différenciation effectrice plus robuste. La persistance fonctionnelle des lymphocytes T est détectée jusqu'à 200 jours ¹⁵⁰.

2.7.3.1.2 Une action chirurgicale sur les tumeurs solides

L'un des principaux freins à l'utilisation de CAR-T cells est la toxicité hors-cibles. Plusieurs méthodes visent une meilleure précision : la sélection fine de TAA, la densité d'expression des TAA ⁶, des CAR ciblant deux antigènes, des CAR avec des commutateurs (gène suicide), déjà décrits dans les précédents paragraphes.

2.7.3.1.3 D'un environnement immunosuppresseur à un environnement antitumoral

L'efficacité de CAR-T cell est circonscrite par deux aspects du micro-environnement :

- Les caractéristiques intrinsèques, comme l'hypoxie, un pH acide, la déplétion en acides aminés (arginine et tryptophane) et les cytokines immunosuppressives,
- Les caractéristiques extrinsèques liées aux voix immunosuppressives des LT par les cellules du système immunitaire ou de la tumeur ¹³¹.

Nous avons vu précédemment que la sécrétion d'IL-12 convertit le micro-environnement pro-tumoral en micro-environnement anti-tumoral par le recrutement de cellules immunitaires adéquates. Ainsi, la sécrétion par le CAR-T cell, dit « TRUCK » améliore la thérapie ¹³¹. Les TRUCK ont démontré une efficacité thérapeutique remarquable contre les tumeurs dans les modèles précliniques ^{121,151}. Cette conception instaure un micro-environnement propice à la persistance des CAR-T cells.

Dans le micro-environnement de la tumeur, les cellules CAR-T sont inactivées soit par des signaux négatifs CTLA4 ou PD1 ¹⁵², soit par l'absence de co-stimulation ^{153,154}.

Pour éviter une anergie ou une AICD, le CAR-T cell dit « blindé » peut être génétiquement modifié ; il n'exprime alors plus les différentes molécules de contrôle immunitaire comme CTLA4 ou PD1 ¹³¹. D'autres pistes de CAR-T cells exploitent la conversion des régulations négatives en voies d'activation. Le CAR-T cell construit avec un récepteur PD1 modifié au niveau du domaine cytoplasmique par CD28 a démontré une conversion du signal PDL1 en une co-stimulation ¹⁵⁵. En conséquence, la sécrétion de cytokine, la prolifération et l'activité anti tumorale sont accrues ¹⁵⁵.

2.7.3.1.4 Une combinaison d'immunothérapie

Le domaine de l'immunothérapie du cancer s'est considérablement élargi avec plusieurs nouvelles options thérapeutiques : les anticorps monoclonaux, les inhibiteurs du point de contrôle immunitaire, les vaccins contre le cancer et les immunothérapies adoptives des lymphocytes T. Une combinaison d'immunothérapie aurait une action synergique sur le cancer.

Nous avons vu que l'efficacité des CAR-T cells est restreinte par divers facteurs. L'ajout d'un inhibiteur du point de contrôle à la thérapie de CAR-T cell peut réduire l'effet immunosuppresseur du micro-environnement et ainsi améliorer l'efficacité du traitement. Des essais cliniques combinant les CAR-T cells avec les inhibiteurs du point de contrôle sont en cours sur le cancer de la prostate métastaté ¹⁵⁶. La combinaison d'immunothérapies présente un grand potentiel pour traiter les tumeurs solides.

2.7.3.2 Donnée cliniques

Jusqu'à présent, environ trente-neuf essais cliniques de CAR-T cell sont répertoriés sur ClinicalTrials.gov comme l'indique le Tableau 7. La plupart des essais ciblent des antigènes des cancers solides, d'autres des récepteurs responsables de la croissance tumorales. Cependant de nouvelles cibles sont apparues comme des antigènes mutés issus de modification posttraductionnelle ¹⁵⁷.

Conclusion

En conclusion, le système immunitaire est un formidable outil mis en place par notre organisme pour lutter contre le cancer. Par le prisme de l'immunosurveillance, l'équilibre et la résistance, l'immuno-édition entretient un lien étroit avec la cancérogenèse. La résilience du processus donne espoir au chercheur quant à l'utilité de l'immunothérapie. La thérapie cellulaire adoptive à l'aide de lymphocytes T pour traiter le cancer n'est pas d'aujourd'hui. Le perfectionnement de cette technique a abouti à la réalisation d'un néo-lymphocyte appelé lymphocyte T à récepteur d'antigène chimérique. Ce récepteur d'origine chimérique permet de cibler spécifiquement un antigène de façon CMH-indépendant. Les néo-lymphocytes se sont principalement illustrés dans le traitement d'hémopathie maligne exprimant l'antigène CD19. Bien que les essais cliniques fussent spectaculaire, la thérapie de CAR-T cell est cantonné aux cancers exprimant l'antigène CD19. La FDA a par ailleurs autorisé la mise sur le marché du kymriah® dans le traitement des LLA chez l'adulte de moins de 25 ans.

Cependant, la primeur de cette avancée impose aux chercheurs et cliniciens des avancé dans les sciences fondamentales. Pour une application à grande échelle de cette classe médicamenteuse, le seul choix de l'antigène cible ne suffit pas. La standardisation et l'uniformisation de la production sont un élément-clef notamment la proportion de lymphocyte T CD4, CD8 ou à mémoire centrale. En outre la toxicité est relativement conséquente par l'effet hors cible et le syndrome de relargage de cytokines. La conception de CAR-T cell avec soit un gène suicide, soit des systèmes de récepteur inhibiteur ou stimulateur sont à l'étude pour réduire les effets néfastes. Pour finir des efforts doivent être entrepris dans la distribution du médicament jusqu'au sein de la tumeur et sa persistance dans le microenvironnement immunosuppresseur.

La thérapie de CAR-T cell est un axe majeur de lutte contre le cancer. Les pharmaciens se forment d'aujourd'hui pour dispenser demain ce futur médicament.

Annexes

Année	Lauréat	Pays	Recherche
1901	Emil von Behring	Allemagne	Antitoxines sériques
1905	Robert Koch	Allemagne	Immunité cellulaire contre la tuberculose
1908	Elie Metchnikoff Paul Ehrlich	Russie Allemagne	Rôle de la phagocytose (Metchnikoff) et des antitoxines (Ehrlich) dans l'immunité
1913	Charles Richet	France	Anaphylaxie
1919	Jules Bordet	Belgique	Bactériolyse médiée par le complément
1930	Karl Landsteiner	États-Unis	Découverte des groupes sanguins humains
1951	Max Theiler	Afrique du Sud	Développement du vaccin contre la fièvre jaune
1957	Daniel Bovet	Suisse	Antihistaminiques
1960	F. Macfarlane Burnet Peter Medawar	Australie Grande-Bretagne	Découverte de la tolérance immunitaire acquise
1972	Rodney R. Porter Gerald M. Edelman	Grande-Bretagne États-Unis	Structure chimique des anticorps
1977	Rosalyn R. Yalow	États-Unis	Développement des radioimmunosages
1980	George Snell Jean Dausset Baruj Benacerraf	États-Unis France États-Unis	Complexe majeur d'histocompatibilité
1984	Niels K. Jerne Georges E. Köhler Cesar Milstein	Danemark Allemagne Grande-Bretagne	Théories sur la régulation de l'immunité Anticorps monoclonaux
1987	Susumu Tonegawa	Japon	Réarrangement des gènes codant les anticorps
1991	E. Donnall Thomas Joseph Murray	États-Unis États-Unis	Immunologie des transplantations
1996	Peter C. Doherty Rolf M. Zinkernagel	Australie Suisse	Rôle du complexe majeur d'histocompatibilité dans la reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T
2002	Sydney Brenner H. Robert Horvitz J.E. Sulston	Afrique du Sud États-Unis Grande-Bretagne	Régulation génétique du développement des organes et de la mort cellulaire (apoptose)
2008	Harald zur Hausen Françoise Barré-Sinoussi Luc Montagnier	Allemagne France France	Rôle du HPV dans le développement du cancer de l'utérus (Hausen) et découverte du HIV (Barré-Sinoussi et Montagnier)
2011	Jules Hoffman Bruce Beutler Ralph Steinman	France États-Unis États-Unis	Découverte des principes d'activation de l'immunité innée (Hoffman et Beutler) et rôle des cellules dendritiques dans l'immunité adaptative (Steinman)

Tableau 1 : Prix Nobel attribué à la recherche en immunologie innée et adaptative ¹

Caractéristiques	Immunité innée	Immunité adaptative
Délai de réponse	Minutes/heures	Jours
Spécificité	Reconnaissance de molécules et de motifs moléculaires associés aux pathogènes Reconnaissance de molécules produites par les cellules abîmées/mortes	Spécificité fine : discrimine des différences même mineures dans les structures moléculaires de molécules microbiennes ou non microbiennes
Diversité	Nombre limité de récepteurs conservés, codés par la lignée germinale	Diversité poussée ; un grand nombre de récepteurs générés à partir de la recombinaison génétique des gènes codant ces récepteurs
Réponses mémoires	Quelques-unes (observé dans les réponses innées des invertébrés et chez les cellules NK humaines/de souris)	Mémoire persistante, avec une réponse plus rapide et de plus grande ampleur lors des infections ultérieures
Discrimination Soi/non-Soi	Parfaite, absence de motifs spécifiques microbiens chez l'hôte	Très bonne ; échecs occasionnels de discrimination entre le Soi et le non-Soi, entraînant des pathologies autoimmunes.
Composants solubles du sang	Beaucoup de peptides et protéines antimicrobiens et d'autres médiateurs	Anticorps et cytokines
Principaux types cellulaires	Phagocytes (monocytes, macrophages, neutrophiles), cellules NK, autres leucocytes, cellules épithéliales et endothéliales	Cellules T, B, cellules présentatrices d'antigènes (CPA)

Tableau 2 : Les différentes caractéristiques de l'immunité ¹

Malignancy	Patient number	Type of T cells infused	Target antigen	Clinical outcomes	Ref.
Metastatic melanoma	20	TIL	Unknown	1 CR, 10 PR, 1 MR	[15]
Metastatic melanoma	13	TIL	Unknown	6 PR, 4 MR	[51]
Metastatic melanoma	93	TIL	Unknown	22 CR, 34 PR	[16]
Metastatic melanoma	10	CD8 ⁺ T cells	MART1/MelanA or gp 100	5 SD, 1 MR, 2 minor response	[52]
Metastatic melanoma	11	CD8 ⁺ T cells	MelanA	1 CR, 1 PR, 1 MR, 1 SD	[53]
Metastatic melanoma	1	CD4 ⁺ T cells	NY-ESO-1	1 CR	[54]
Metastatic melanoma	14	CD8 ⁺ T cells	MelanA	2 CR, 4 PR, 1 SD	[55]
Metastatic melanoma	11	CD8 ⁺ T cells	MART1/Tyr/gp 100	1 CR, 5 SD	[56]
Metastatic melanoma	17	TCR T cells	MART1	2 PR, 1 MR	[57]
Metastatic melanoma	36	High affinity TCR T cells	MART1 or gp 100	1 CR, 8 PR	[58]
Metastatic melanoma	3	TCR T cells	CEA	1 PR	[59]
Metastatic melanoma/ synovial sarcoma	17	TCR T cells	NY-ESO-1	2 CR, 7 PR	[60]
Metastatic melanoma	9	High affinity TCR T cells	MAGEA3/MAGEA12	1 CR, 4 PR	[61]
Metastatic melanoma/ myeloma	2	High affinity TCR T cells	MAGEA3/Titin	Not evaluable	[62,63]
Neuroblastoma	19	CAR T cells	GD2	3 CR	[64]
Renal carcinoma	12	CAR T cells	CAIX	Not evaluable	[65]
Colon cancer	1	CAR T cells (CD28-4-1BB-CD3ζ)	ERBB2	Not evaluable	[66]
Lymphoma	1	CAR T cells (CD28-CD3ζ)	CD19	1 PR	[67]
Lymphoma and CLL	8	CAR T cells (CD28-CD3ζ)	CD19	1 CR, 5 PR, 1 SD	[68]
CLL	3	CAR T cells (4-1BB-CD3ζ)	CD19	2 CR, 1 PR	[69,70]
ALL	2	CAR T cells (4-1BB-CD3ζ)	CD19	2 CR	[71]
ALL	5	CAR T cells (CD28-CD3ζ)	CD19	5 CR	[72]
ALL	16	CAR T cells (CD28-CD3ζ)	CD19	14 CR	[73]

ALL: Acute lymphoblastic leukemia; CAR: Chimeric antigen receptor; CEA: Carcinoembryonic antigen; CLL: Chronic lymphocytic leukemia; CR: Complete response; MR: Mixed response; PR: Partial response; SD: Stable disease; TCR: T-cell receptor; TIL: Tumor-infiltrating lymphocyte.

Tableau 3 : Liste non exhaustif d'essais cliniques obtenue par des ACT ¹⁴

Trial ID	Phase (status)	CD19 ⁺ B cell malignancy	Vector	CAR gen	TAA	Costimulation/CAR characteristics	Institution
NCT02443831	I (N)	ALL, lymphoma	N/A	N/A	CD19	NOS	UCL, UK
NCT02134262	I/II (R)	Lymphoma	RVV	II	CD19	CD28	Jichi Medical University, Japan
NCT02546739	I (N)	ALL, CLL, lymphoma	N/A	N/A	CD19	NOS	Beijing Doing Biomedical, China
NCT02656147	I (N)	ALL, CLL, lymphoma	N/A	N/A	CD19	$\gamma\delta$ TCs	Beijing Doing Biomedical, China
NCT02051257	I (R)	Lymphoma	LVV	II	CD19, EGFR ζ	CD28/enriched T _{CM} vs. T _{N/MEM}	COHMC, US
NCT02247609	I/II (R)	Lymphoma	LVV	IV	CD19	CD27 + caspase-9	Peking University, China
NCT01815749	I (A)	Lymphoma, HCL, WM	SIN-LVV	II	CD19	CD28/enriched T _{CM}	COHMC, US
NCT02772198	I/II (N)	ALL, lymphoma	RVV	II	CD19	CD28	Sheba Medical Center, Israel
NCT02652910	I/II (R)	ALL, CLL, lymphoma	RVV	II	CD19	CD28 culturing; IL-2 vs. IL-15/17	Xinqiao Hospital, Chongqing, China
NCT01865617	I/II (R)	ALL, CLL, lymphoma	LVV	II	CD19, EGFR ζ	4-1BB	FHCRC, US
NCT02146924	I (R)	ALL	LVV	II	CD19, EGFR ζ	CD28/T _{CM} vs. T _{N/MEM}	COHMC, US
NCT00586391	I (A)	ALL, CLL, lymphoma	RVV	II	CD19	CD28	BCM, US
NCT02456350	I (R)	ALL, CLL, lymphoma	RVV/LVV	II	CD19	CD28/suicide switch	SSPH, China
NCT02081937	I/II (R)	Lymphoma	RVV	II	CD19	4-1BB	CPGH, China
NCT02050347	I (R)	ALL, CLL, lymphoma	RVV	II	CD19	CD28	BCM, US
NCT02672501	I/II (R)	ALL, CLL	LVV	II	CD19	4-1BB	Shanghai GeneChem, China
NCT02153580	I (A)	ALL, CLL, lymphoma	LVV	II	CD19, EGFR ζ	CD28/enriched T _{CM}	COHMC, US
NCT00924326	I (A)	Lymphoma	RVV	II	CD19	CD28	NCI, US
NCT01893279	I (A)	Leukemia	LVV	N/A	CD19, EGFR ζ	NOS	Seattle Children's Hospital, US
NCT00840853	I (A)	ALL, CLL, lymphoma	RVV	N/A	CD19	Trispecific VST (CMV, EBV, Ad)	BCM, US
NCT01593696	I (A)	ALL, lymphoma	RVV	II	CD19	CD28	NCI, US
NCT01864889	NA (R)	ALL, CLL, lymphoma	RVV	II	CD19	4-1BB	CPGH, China
NCT02028455	I/II (R)	ALL	LVV	II	CD19, EGFR ζ	4-1BB	Seattle Children's Hospital, US
NCT01475058	I/II (C)	ALL, CLL, lymphoma	N/A	N/A	CD19	Bispecific VST _{CM} (CMV/EBV)	FHCRC US
NCT01087294	I (S)	Leukemia, lymphoma	N/A	N/A	CD19	NOS	NCI, US
NCT01853631	I (R)	ALL, CLL, lymphoma	RVV	II/III	CD19	CD28 or CD28.4-1BB	BCM, US
NCT02686670	I/II (N)	Leukemia, lymphoma	N/A	II	CD19	CD28 vs. 4-1BB	Hospital of Henan, China
NCT02737085	I/II (R)	Lymphoma	N/A	N/A	CD19, CD20	NOS	Southwest Hospital, China
NCT01195480	I/II (C)	ALL	RVV	I	CD19	CD3 ζ -VST (EBV)	UCL, UK
NCT02659943	I (R)	Lymphoma	N/A	N/A	CD19	Fully humanized CAR (NOS)	NCI, US
NCT02277522	0 (R)	Lymphoma	RNA	II	CD19	4-1BB	UPenn, US
NCT01029366	NA (C)	Leukemia, lymphoma	RVV/LVV	II	CD19	4-1BB	UPenn, US
NCT00709033	I (A)	CLL, lymphoma	N/A	I/II	CD19	CD28 vs. CD3 ζ -VST (EBV)	BCM, US
NCT02624258	0 (R)	Lymphoma	RNA	II	CD19	4-1BB	UPenn, US
NCT02706405	I (N)	Lymphoma	LVV	N/A	CD19	Coadministered PD-L1 antagonist	FHCRC, US
NCT02349698	I/II (R)	Leukemia, lymphoma	N/A	N/A	CD19	NOS	Southwest Hospital, China
NCT02537977	I/II (R)	ALL, CLL, lymphoma	N/A	II	CD19	NOS	Shanghai Tongji Hospital, China
NCT02445222	NA (R)	Previously treated patients	LVV	N/A	CD19	Previously treated CAR TC patients	Novartis Pharmaceuticals
NCT02348216	I/II (R)	Lymphoma	N/A	N/A	CD19	KTE-C19	Kite Pharma, Inc., US
NCT02614066	I/II (R)	ALL	N/A	N/A	CD19	KTE-C19	Kite Pharma, Inc., US
NCT02625480	I/II (R)	ALL	N/A	N/A	CD19	KTE-C19	Kite Pharma, Inc., US
NCT02801313	I/II (R)	Lymphoma	N/A	N/A	CD19	KTE-C19	Kite Pharma, Inc., US
NCT02547948	I/II (R)	Lymphoma	RVV	II	CD19	CD28	Fuda Cancer Hospital, China
NCT02132624	I/II (R)	Leukemia, lymphoma	RVV	III	CD19	CD28 + 4-1BB	Uppsala University, Sweden
NCT02529813	I (R)	Leukemia, lymphoma	N/A	N/A	CD19	NOS	M.D. Anderson Cancer Center, US
NCT02431988	I (N)	Lymphoma	N/A	N/A	CD19	NOS	UCL, UK
NCT01840566	I (A)	Lymphoma	N/A	N/A	CD19	CD28	MSKCC, US
NCT02735291	I/II (R)	Leukemia	N/A	N/A	CD19	NOS	Sinobioway Cell Therapy Co., China
NCT02728882	I/II (R)	Lymphoma	N/A	N/A	CD19	NOS	Sinobioway Cell Therapy Co., China
NCT02535364	II (R)	ALL	N/A	N/A	CD19	JCAR015 CAR (NOS)	Juno Therapeutics, Inc., US
NCT02208362	I (R)	Glioblastoma	SIN-LVV	II	CD19, IL13R α 2	IL13R α 2-specific 4-1BB-CD19 ζ CAR T _{CM}	COHMC, US
NCT01860937	I (R)	ALL	N/A	N/A	CD19	CD28	MSKCC, US
NCT02030847	II (R)	ALL	LVV	II	CD19	4-1BB	UPenn, US
NCT01318317	I/II (A)	Lymphoma	LVV	N/A	CD19	NOS/enriched T _{CM}	COHMC, US
NCT01826495	I (A)	Leukemia, lymphoma	LVV	II	CD19	4-1BB	UPenn, US
NCT02465983	I (A)	Pancreatic cancer	LVV	II	CD19, mesothelin	4-1BB	UPenn, US
NCT01430390	I (R)	ALL, lymphoma	N/A	N/A	CD19	CD28/VST (EBV)	MSKCC, US
NCT00466531	I/II (R)	CLL, lymphoma	RVV/LVV	II	CD19	CD28 + 4-1BB	MSKCC, US

Tableau 4 : Différents essais cliniques de CAR-T cell anti-CD19 enregistré en 2016⁵⁷

Toxicité	Symptômes	Prise en charge
Syndrome de relargage des cytokine	Hypotension Fièvre Complications neurologiques Défaillance multiorganique	Tocilizumab
Toxicité neurologique	Encéphalopathie Confusion Délire Convulsions Myoclonies Tremblements Troubles de la marche Paralysie Apraxie Aphasie Hallucinations visuelles	Dexmathémasone maximum 15 jours
Effet hors cible	Aplasie de lymphocyte B	Perfusion d'immunoglobulines

Tableau 5 : La toxicité générale de CAR-T cell anti-CD19

Target	CAR structure	Malignancy	Institution	Reference
CD22	CD3ζ and CD28	FL, NHL, DLBCL, B-ALL	NCI	NCT02315612 (REF. 34)
CD20	CD3ζ or CD3ζ and 4-1BB	CD20-positive malignancies	PLA General Hospital	NCT01735604 (REF. 47)
ROR1	CD3ζ and 4-1BB	CLL, SLL	MD Anderson	NCT02194374 (REF. 36)
Igκ	CD3ζ and CD28	CLL, low-grade B-cell malignancies	Baylor	NCT00881920 (REF. 37)
CD30	CD3ζ and CD28	HL, NHL	Baylor	NCT01316146 (REF. 56)
CD123	CD3ζ and CD28	AML	City of Hope	NCT02159495 (REF. 41)
CD33	CD3ζ and 4-1BB	AML	PLA General Hospital	NCT01864902 (REF. 40)
LeY	CD3ζ and CD28	AML	Peter Mac	NCT01716364 (REF. 42)
BCMA	CD3ζ and 4-1BB	MM	NCI	NCT02215967 (REF. 38)
CD138	CD3ζ and 4-1BB	MM	PLA General Hospital	NCT01886976 (REF. 39)

Tableau 6 : Les Cibles de CAR-T cell pour le traitement des hémopathie malignes⁵⁵

CAR target	Tumor histology	NCT#	Location/Sponsor
HER2	Breast cancer	NCT02547961	China
CEA	Lung/Colorectal/Gastric/Breast/Pancreatic	NCT02349724	China
CEA	Breast/colorectal/gastric/lung/ovarian/pancreatic/solid tumor	NCT01212887	Cancer Res UK
CEA	Metastatic adenocarcinomas	NCT01723306	Roger Williams Medical Center
CEA	Liver metastases (via hepatic artery)	NCT02416466	Roger Williams Medical Center
cMet	Breast	NCT01837602	UPENN
GD2	Sarcoma/osteosarcoma/neuroblastoma/melanoma	NCT02107963	NCI
GD2 iC9 VZV	Sarcomas	NCT01953900	Baylor
Mesothelin	Pancreatic/Ovarian/Mesothelioma	NCT02159716	UPENN
Mesothelin	Pancreatic/Mesothelioma/Ovarian/Metastatic	NCT01583686	NCI
Mesothelin iC9	Mesothelioma/Lung/Breast	NCT02414269	MSKCC
HER2	Glioblastoma	NCT02442297	Baylor
HER2	Breast/ovarian/lung/gastric/colorectal/glioma/pancreatic	NCT02713984	China
GD2 iC9	Neuroblastoma	NCT01822652	Baylor
Meso/CD19	Pancreatic	NCT02465983	UPENN
HER2	Sarcoma	NCT00902044	Baylor
GD2 NKs	Neuroblastoma	NCT02439788	Baylor
EGFRvIII	Glioblastoma	NCT02209376	UPENN
EGFRvIII	Malignant glioma/Glioblastoma	NCT01454596	NCI
EGFRvIII	Glioblastoma	NCT02664363	Duke University
MUC1	Malignant glioma/colorectal/gastric	NCT02617134	China
MUC1	Hepatocellular/NSCLC/Pancreatic/Breast cancer	NCT02587689	China
EphA2	Malignant glioma	NCT02575261	China
HER2/EBV TGFB	HER2-positive malignancies	NCT00889954	Baylor
HER2 CMV	Glioblastoma	NCT01109095	Baylor
EGFR	Advanced glioma	NCT02331693	China
EGFR	EGFR positive solid tumors	NCT01869166	China
GPC3	Hepatocellular	NCT02395250	China
GPC3	Hepatocellular	NCT02715362	China
CD171	Neuroblastoma/ganglioneuroblastoma	NCT02311621	Seattle Children's
Mesothelin	Pancreatic	NCT02706782	China
Mesothelin	Mesothelioma/Pancreatic/Ovarian/Breast/Endometrial/Other	NCT02580747	China
CD133	Liver/Pancreatic/Brain/Breast/Ovarian/Colorectal	NCT02541370	China
HER2	HER2 positive solid tumors	NCT01935843	China
FAP	Mesothelioma	NCT01722149	U of Zurich
IL13R α 2 (zetakine)	Malignant glioma	NCT02208362	City of Hope
ROR1	Breast/NSCLC	NCT02706392	Fred Hutchinson
PSMA	Renal/Melanoma/Metastatic	NCT01218867	NCI
PSMA	Prostate	NCT01140373	MSKCC

Tableau 7 : Essais cliniques en cours de CAR-T cell ciblant des cancers solides¹³⁰

Bibliographie

1. Owen, J., Punt, J. & Stranford, S. *Immunologie - 7e édition: Le cours de Janis Kuby avec questions de révision*. (Dunod, 2014).
2. Sharpe, M. & Mount, N. Genetically modified T cells in cancer therapy: opportunities and challenges. *Dis. Model. Mech.* **8**, 337–350 (2015).
3. Smith, A. J., Oertle, J., Warren, D. & Prato, D. Chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy for malignant cancers: Summary and perspective. *J. Cell. Immunother.*
4. Abbas, A. K. *et al. Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique*. (Elsevier-Masson, 2016).
5. Robb, L. Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. *Oncogene* **26**, 6715–6723 (2007).
6. Fesnak, A. D., June, C. H. & Levine, B. L. Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 566–581 (2016).
7. Schwartz, R. H. T cell anergy. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 305–334 (2003).
8. Zitvogel, L., Tesniere, A. & Kroemer, G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 715–727 (2006).
9. Guo, Ry, L., Hugues, S. & phanie. Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity. *BioMed Res. Int.* **2015**, e314620 (2015).
10. Frey, A. B. Suppression of T cell responses in the tumor microenvironment. *Vaccine* **33**, 7393–7400 (2015).
11. Multiple-Purpose Immunotherapy for Cancer. *PubMed Journals* Available at: <https://ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/26653546/>. (consulté le 21 mars 2017)
12. Immunologie (6^e Éd.) CHATENOUD Lucienne, BACH Jean-François. *Librairie Lavoisier* Available at: <http://www.lavoisier.fr/livre/medecine/immunologie-6-ed/chatenoud/descriptif-9782257205292>. (consulté le 27 février 2017)
13. Jemal, A. *et al.* Global cancer statistics. *CA. Cancer J. Clin.* **61**, 69–90 (2011).
14. Wang, M., Yin, B., Wang, H. Y. & Wang, R.-F. Current advances in T-cell-based cancer immunotherapy. *Immunotherapy* **6**, 1265–1278 (2014).
15. L'essentiel de la biologie cellulaire (3^e Éd.) ALBERTS Bruce, BRAY Dennis, HOPKIN Karen, JOHNSON Alexander, LEWIS Julian, RAFF Martin, ROBERTS Keith,

WALTER Peter. *Librairie Lavoisier* Available at: <http://www.lavoisier.fr/livre/sciences-de-la-vie/l-essentiel-de-la-biologie-cellulaire-3-ed/alberts/descriptif-9782257204028>. (consulté le 6 février 2017)

16. Oliveira, P. A. *et al.* Chemical carcinogenesis. *An. Acad. Bras. Cienc.* **79**, 593–616 (2007).
17. Grivennikov, S. I., Greten, F. R. & Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**, 883–899 (2010).
18. Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D. & Smyth, M. J. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 235–271 (2011).
19. Burnet, M. Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br. Med. J.* **1**, 779–786 (1957).
20. Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. & Schreiber, R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* **3**, 991–998 (2002).
21. Dunn, G. P., Old, L. J. & Schreiber, R. D. The three Es of cancer immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 329–360 (2004).
22. Smyth, M. J., Dunn, G. P. & Schreiber, R. D. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv. Immunol.* **90**, 1–50 (2006).
23. Vesely, M. D. & Schreiber, R. D. Cancer immunoediting: antigens, mechanisms, and implications to cancer immunotherapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1284**, 1–5 (2013).
24. Schreiber, R. D., Old, L. J. & Smyth, M. J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* **331**, 1565–1570 (2011).
25. Shankaran, V. *et al.* IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* **410**, 1107–1111 (2001).
26. Meirou, Y., Kanterman, J. & Baniyash, M. Paving the Road to Tumor Development and Spreading: Myeloid-Derived Suppressor Cells are Ruling the Fate. *Front. Immunol.* **6**, 523 (2015).
27. Engels, B. *et al.* Relapse or eradication of cancer is predicted by peptide-MHC affinity. *Cancer Cell* **23**, 516–526 (2013).
28. Swann, J. B. & Smyth, M. J. Immune surveillance of tumors. *J. Clin. Invest.* **117**, 1137–1146 (2007).
29. Bui, J. D. & Schreiber, R. D. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 203–208

(2007).

30. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. & Ugolini, S. Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* **9**, 503–510 (2008).
31. Sivori, S. *et al.* CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: Induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 10116–10121 (2004).
32. Smyth, M. J. *et al.* Differential Tumor Surveillance by Natural Killer (Nk) and Nkt Cells. *J. Exp. Med.* **191**, 661–668 (2000).
33. Mantovani, A. & Sica, A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr. Opin. Immunol.* **22**, 231–237 (2010).
34. Kersten, K., Salvagno, C. & de Visser, K. E. Exploiting the Immunomodulatory Properties of Chemotherapeutic Drugs to Improve the Success of Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* **6**, 516 (2015).
35. Lewis, C. E. & Pollard, J. W. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res.* **66**, 605–612 (2006).
36. Fridlender, Z. G. *et al.* Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: ‘N1’ versus ‘N2’ TAN. *Cancer Cell* **16**, 183–194 (2009).
37. Nefedova, Y. *et al.* Regulation of dendritic cell differentiation and antitumor immune response in cancer by pharmacologic-selective inhibition of the janus-activated kinase 2/signal transducers and activators of transcription 3 pathway. *Cancer Res.* **65**, 9525–9535 (2005).
38. Galaine, J., Borg, C., Godet, Y. & Adotévi, O. Interest of Tumor-Specific CD4 T Helper 1 Cells for Therapeutic Anticancer Vaccine. *Vaccines* **3**, 490–502 (2015).
39. Zou, W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 263–274 (2005).
40. Coussens, L. M. & Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* **420**, 860–867 (2002).
41. Farkona, S., Diamandis, E. P. & Blasutig, I. M. Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? *BMC Med.* **14**, (2016).
42. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
43. Sharma, P., Wagner, K., Wolchok, J. D. & Allison, J. P. Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit: recent successes and next steps. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 805–812 (2011).

44. Grupp, S. A. *et al.* Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **368**, 1509–1518 (2013).
45. Rosenberg, S. A. *et al.* Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N. Engl. J. Med.* **319**, 1676–1680 (1988).
46. Gilham, D. E. *et al.* Adoptive T-cell therapy for cancer in the United kingdom: a review of activity for the British Society of Gene and Cell Therapy annual meeting 2015. *Hum. Gene Ther.* **26**, 276–285 (2015).
47. Park, T. S., Rosenberg, S. A. & Morgan, R. A. Treating Cancer with Genetically Engineered T Cells. *Trends Biotechnol.* **29**, 550–557 (2011).
48. Kershaw, M. H., Westwood, J. A. & Darcy, P. K. Gene-engineered T cells for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 525–541 (2013).
49. Yee, C. The use of endogenous T cells for adoptive transfer. *Immunol. Rev.* **257**, 250–263 (2014).
50. Shi, H., Liu, L. & Wang, Z. Improving the efficacy and safety of engineered T cell therapy for cancer. *Cancer Lett.* **328**, 191–197 (2013).
51. Khalil, D. N., Smith, E. L., Brentjens, R. J. & Wolchok, J. D. The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **13**, 273–290 (2016).
52. van der Stegen, S. J. C., Hamieh, M. & Sadelain, M. The pharmacology of second-generation chimeric antigen receptors. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 499–509 (2015).
53. Sadelain, M., Brentjens, R. & Rivière, I. The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discov.* **3**, 388–398 (2013).
54. Haji-Fatahaliha, M. *et al.* CAR-modified T-cell therapy for cancer: an updated review. *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.* **44**, 1339–1349 (2016).
55. Jackson, H. J., Rafiq, S. & Brentjens, R. J. Driving CAR T-cells forward. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **13**, 370–383 (2016).
56. Abate-Daga, D. & Davila, M. L. CAR models: next-generation CAR modifications for enhanced T-cell function. *Mol. Ther. — Oncolytics* **3**, 16014 (2016).
57. Schubert, M.-L. *et al.* Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy Targeting CD19-Positive Leukemia and Lymphoma in the Context of Stem Cell Transplantation. *Hum. Gene Ther.* **27**, 758–771 (2016).
58. Maher, J., Brentjens, R. J., Gunset, G., Rivière, I. & Sadelain, M. Human T-

lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCR ζ /CD28 receptor. *Nat. Biotechnol.* **20**, 70–75 (2002).

59. Carpenito, C. *et al.* Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 3360–3365 (2009).
60. Zhong, X.-S., Matsushita, M., Plotkin, J., Riviere, I. & Sadelain, M. Chimeric antigen receptors combining 4-1BB and CD28 signaling domains augment PI3kinase/AKT/Bcl-XL activation and CD8⁺ T cell-mediated tumor eradication. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **18**, 413–420 (2010).
61. Jensen, M. C. & Riddell, S. R. Designing chimeric antigen receptors to effectively and safely target tumors. *Curr. Opin. Immunol.* **33**, 9–15 (2015).
62. Berger, C. *et al.* Safety of Targeting ROR1 in Primates with Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells. *Cancer Immunol. Res.* **3**, 206–216 (2015).
63. Hombach, A., Hombach, A. A. & Abken, H. Adoptive immunotherapy with genetically engineered T cells: modification of the IgG1 Fc ‘spacer’ domain in the extracellular moiety of chimeric antigen receptors avoids ‘off-target’ activation and unintended initiation of an innate immune response. *Gene Ther.* **17**, 1206–1213 (2010).
64. Norelli, M., Casucci, M., Bonini, C. & Bondanza, A. Clinical pharmacology of CAR-T cells: Linking cellular pharmacodynamics to pharmacokinetics and antitumor effects. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **1865**, 90–100 (2016).
65. Töpfer, K. *et al.* DAP12-based activating chimeric antigen receptor for NK cell tumor immunotherapy. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **194**, 3201–3212 (2015).
66. Wang, X. & Rivière, I. Clinical manufacturing of CAR T cells: foundation of a promising therapy. *Mol. Ther. Oncolytics* **3**, 16015 (2016).
67. Fesnak, A., Lin, C., Siegel, D. L. & Maus, M. V. CAR-T Cell Therapies From the Transfusion Medicine Perspective. *Transfus. Med. Rev.* **30**, 139–145 (2016).
68. Gill, S., Maus, M. V. & Porter, D. L. Chimeric antigen receptor T cell therapy: 25 years in the making. *Blood Rev.* **30**, 157–167 (2016).
69. Kay, M. A. State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 316–328 (2011).
70. Vargas, J. E. *et al.* Retroviral vectors and transposons for stable gene therapy: Advances, current challenges and perspectives. *ResearchGate* **14**, (2016).
71. Wang, X. & Rivière, I. Manufacture of tumor- and virus-specific T lymphocytes for

- adoptive cell therapies. *Cancer Gene Ther.* **22**, 85–94 (2015).
72. Deichmann, A. & Schmidt, M. Biosafety considerations using gamma-retroviral vectors in gene therapy. *Curr. Gene Ther.* **13**, 469–477 (2013).
73. Hacein-Bey-Abina, S. *et al.* A Serious Adverse Event after Successful Gene Therapy for X-Linked Severe Combined Immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* **348**, 255–256 (2003).
74. Mátrai, J. *et al.* Hepatocyte-targeted expression by integrase-defective lentiviral vectors induces antigen-specific tolerance in mice with low genotoxic risk. *Hepatology*. *Baltim. Md* **53**, 1696–1707 (2011).
75. Monjezi, R. *et al.* Enhanced CAR T-cell engineering using non-viral Sleeping Beauty transposition from minicircle vectors. *Leukemia* (2016). doi:10.1038/leu.2016.180
76. Xu, Y. *et al.* Closely related T-memory stem cells correlate with in vivo expansion of CAR-CD19-T cells and are preserved by IL-7 and IL-15. *Blood* **123**, 3750–3759 (2014).
77. Adoptive Therapy With Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells: The Cancer Journal. *LWW* Available at: http://journals.lww.com/journalppo/Fulltext/2014/03000/Adoptive_Therapy_With_Chimeric_Antigen.9.aspx. (consulté le 5 janvier 2017)
78. Sommermeyer, D. *et al.* Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8⁺ and CD4⁺ subsets confer superior antitumor reactivity in vivo. *Leukemia* **30**, 492–500 (2016).
79. Turtle, C. J. *et al.* CD19 CAR–T cells of defined CD4⁺:CD8⁺ composition in adult B cell ALL patients. *J. Clin. Invest.* **126**, 2123–2138
80. Stemberger, C. *et al.* Novel serial positive enrichment technology enables clinical multiparameter cell sorting. *PLoS One* **7**, e35798 (2012).
81. Bonifant, C. L., Jackson, H. J., Brentjens, R. J. & Curran, K. J. Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Mol. Ther. — Oncolytics* **3**, 16011 (2016).
82. Casucci, M., Hawkins, R. E., Dotti, G. & Bondanza, A. Overcoming the toxicity hurdles of genetically targeted T cells. *Cancer Immunol. Immunother.* **64**, 123–130 (2015).
83. Davila, M. L. & Sadelain, M. Biology and clinical application of CAR T cells for B cell malignancies. *Int. J. Hematol.* **104**, 6–17 (2016).
84. Casucci, M. *et al.* CD44v6-targeted T cells mediate potent antitumor effects against acute myeloid leukemia and multiple myeloma. *Blood* **122**, 3461–3472 (2013).
85. Chakravarti, D. & Wong, W. W. Synthetic biology in cell-based cancer immunotherapy. *Trends Biotechnol.* **33**, 449–461 (2015).

86. Fedorov, V. D., Themeli, M. & Sadelain, M. PD-1– and CTLA-4–Based Inhibitory Chimeric Antigen Receptors (iCARs) Divert Off-Target Immunotherapy Responses. *Sci. Transl. Med.* **5**, 215ra172-215ra172 (2013).
87. Beatty, G. L. *et al.* Mesothelin-Specific Chimeric Antigen Receptor mRNA-Engineered T Cells Induce Antitumor Activity in Solid Malignancies. *Cancer Immunol. Res.* **2**, 112–120 (2014).
88. Russo, V. *et al.* A dual role for genetically modified lymphocytes in cancer immunotherapy. *Trends Mol. Med.* **18**, 193–200 (2012).
89. Wang, X. *et al.* A transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, in vivo tracking, and ablation of engineered cells. *Blood* **118**, 1255–1263 (2011).
90. Serafini, M. *et al.* Characterization of CD20-transduced T lymphocytes as an alternative suicide gene therapy approach for the treatment of graft-versus-host disease. *Hum. Gene Ther.* **15**, 63–76 (2004).
91. Philip, B. *et al.* A highly compact epitope-based marker/suicide gene for easier and safer T-cell therapy. *Blood* **124**, 1277–1287 (2014).
92. Minagawa, K., Zhou, X., Mineishi, S. & Di Stasi, A. Seatbelts in CAR therapy: How Safe Are CARs? *Pharmaceuticals* **8**, 230–249 (2015).
93. Kershaw, M. H. *et al.* A Phase I Study on Adoptive Immunotherapy Using Gene-Modified T Cells for Ovarian Cancer. *Clin. Cancer Res.* **12**, 6106–6115 (2006).
94. Ritchie, D. S. *et al.* Persistence and Efficacy of Second Generation CAR T Cell Against the LeY Antigen in Acute Myeloid Leukemia. *Mol. Ther.* **21**, 2122–2129 (2013).
95. Huang, H. *et al.* VEGF suppresses T-lymphocyte infiltration in the tumor microenvironment through inhibition of NF- κ B-induced endothelial activation. *FASEB J.* **29**, 227–238 (2015).
96. Ahmed, N. *et al.* Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) –Specific Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells for the Immunotherapy of HER2-Positive Sarcoma. *J. Clin. Oncol.* **33**, 1688–1696 (2015).
97. Local Delivery of Interleukin-12 Using T Cells Targeting VEGF Receptor-2 Eradicates Multiple Vascularized Tumors in Mice. *PubMed Journals* Available at: <https://ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/22291136/> (consulté le 22 février 2017)
98. Choi, B. D. *et al.* Intracerebral delivery of a third generation EGFRvIII-specific chimeric antigen receptor is efficacious against human glioma. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* **21**, 189–190 (2014).

99. Dotti, G. *et al.* Human cytotoxic T lymphocytes with reduced sensitivity to Fas-induced apoptosis. *Blood* **105**, 4677–4684 (2005).
100. Eaton, D., Gilham, D. E., O’Neill, A. & Hawkins, R. E. Retroviral transduction of human peripheral blood lymphocytes with Bcl-X(L) promotes in vitro lymphocyte survival in pro-apoptotic conditions. *Gene Ther.* **9**, 527–535 (2002).
101. Charo, J. *et al.* Bcl-2 Overexpression Enhances Tumor-Specific T-Cell Survival. *Cancer Res.* **65**, 2001–2008 (2005).
102. Shin, J. H. *et al.* Positive conversion of negative signaling of CTLA4 potentiates antitumor efficacy of adoptive T-cell therapy in murine tumor models. *Blood* **119**, 5678–5687 (2012).
103. Gattinoni, L., Klebanoff, C. A. & Restifo, N. P. Paths to stemness: building the ultimate antitumor T cell. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 671–684 (2012).
104. Bondanza, A. *et al.* Suicide gene therapy of graft-versus-host disease induced by central memory human T lymphocytes. *Blood* **107**, 1828–1836 (2006).
105. Klebanoff, C. A. *et al.* Central memory self/tumor-reactive CD8⁺ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 9571–9576 (2005).
106. Louis, C. U. *et al.* Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma. *Blood* **118**, 6050–6056 (2011).
107. Dudley, M. E. *et al.* Cancer Regression and Autoimmunity in Patients After Clonal Repopulation with Antitumor Lymphocytes. *Science* **298**, 850–854 (2002).
108. Dudley, M. E. *et al.* Adoptive Cell Transfer Therapy Following Non-Myeloablative but Lymphodepleting Chemotherapy for the Treatment of Patients With Refractory Metastatic Melanoma. *J. Clin. Oncol.* **23**, 2346–2357 (2005).
109. Wallen, H. *et al.* Fludarabine modulates immune response and extends in vivo survival of adoptively transferred CD8 T cells in patients with metastatic melanoma. *PLoS One* **4**, e4749 (2009).
110. Guimond, M. *et al.* Interleukin 7 signaling in dendritic cells regulates the homeostatic proliferation and niche size of CD4⁺ T cells. *Nat. Immunol.* **10**, 149–157 (2009).
111. Cieri, N. *et al.* Generation of human memory stem T cells after haploidentical T-replete hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **125**, 2865–2874 (2015).
112. Allegra, A., Innao, V., Gerace, D., Vaddinelli, D. & Musolino, C. Adoptive immunotherapy for hematological malignancies: Current status and new insights in chimeric

- antigen receptor T cells. *Blood Cells. Mol. Dis.* **62**, 49–63 (2016).
113. Kudo, K. *et al.* T Lymphocytes Expressing a CD16 Signaling Receptor Exert Antibody-Dependent Cancer Cell Killing. *Cancer Res.* **74**, 93–103 (2014).
114. Urbanska, K. *et al.* A universal strategy for adoptive immunotherapy of cancer through use of a novel T-cell antigen receptor. *Cancer Res.* **72**, 1844–1852 (2012).
115. Tamada, K. *et al.* Redirecting gene-modified T cells toward various cancer types using tagged antibodies. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **18**, 6436–6445 (2012).
116. Torikai, H. *et al.* A foundation for universal T-cell based immunotherapy: T cells engineered to express a CD19-specific chimeric-antigen-receptor and eliminate expression of endogenous TCR. *Blood* **119**, 5697–5705 (2012).
117. Reyes, L. M. *et al.* Creating Class I MHC–Null Pigs Using Guide RNA and the Cas9 Endonuclease. *J. Immunol.* **193**, 5751–5757 (2014).
118. Holzinger, A., Barden, M. & Hinrich Abken. The growing world of CAR T cell trials: a systematic review. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **65**, 1433–1450 (2016).
119. Chmielewski, M. & Abken, H. CAR T cells transform to trucks: chimeric antigen receptor-redirected T cells engineered to deliver inducible IL-12 modulate the tumour stroma to combat cancer. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **61**, 1269–1277 (2012).
120. Pegram, H. J. *et al.* IL-12-secreting CD19-targeted cord blood-derived T cells for the immunotherapy of B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **29**, 415–422 (2015).
121. Zhang, L. *et al.* Improving adoptive T cell therapy by targeting and controlling IL-12 expression to the tumor environment. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **19**, 751–759 (2011).
122. Yeku, O. O. & Brentjens, R. J. Armored CAR T-cells: utilizing cytokines and pro-inflammatory ligands to enhance CAR T-cell anti-tumour efficacy. *Biochem. Soc. Trans.* **44**, 412–418 (2016).
123. Torikai, H. & Cooper, L. J. Translational Implications for Off-the-shelf Immune Cells Expressing Chimeric Antigen Receptors. *Mol. Ther.* **24**, 1178–1186 (2016).
124. Mirzaei, H. R., Mirzaei, H., Lee, S. Y., Hadjati, J. & Till, B. G. Prospects for chimeric antigen receptor (CAR) $\gamma\delta$ T cells: A potential game changer for adoptive T cell cancer immunotherapy. *Cancer Lett.* **380**, 413–423 (2016).
125. Deniger, D. C. *et al.* Bispecific T-cells Expressing Polyclonal Repertoire of Endogenous $\gamma\delta$ T-cell Receptors and Introduced CD19-specific Chimeric Antigen Receptor. *Mol. Ther.* **21**, 638–647 (2013).
126. Rischer, M. *et al.* Human $\gamma\delta$ T cells as mediators of chimaeric-receptor redirected anti-

- tumour immunity. *Br. J. Haematol.* **126**, 583–592 (2004).
127. Miller, J. S. *et al.* Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood* **105**, 3051–3057 (2005).
128. Zakrzewski, J. L. *et al.* Tumor immunotherapy across MHC barriers using allogeneic T-cell precursors. *Nat. Biotechnol.* **26**, 453–461 (2008).
129. Themeli, M., Rivière, I. & Sadelain, M. New Cell Sources for T Cell Engineering and Adoptive Immunotherapy. *Cell Stem Cell* **16**, 357–366 (2015).
130. Johnson, L. A. & June, C. H. Driving gene-engineered T cell immunotherapy of cancer. *Cell Res.* **27**, 38–58 (2017).
131. Zhang, H. *et al.* New Strategies for the Treatment of Solid Tumors with CAR-T Cells. *Int. J. Biol. Sci.* **12**, 718–729 (2016).
132. Carter, R. H. & Fearon, D. T. CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. *Science* **256**, 105–107 (1992).
133. Scheuermann, R. H. & Racila, E. CD19 antigen in leukemia and lymphoma diagnosis and immunotherapy. *Leuk. Lymphoma* **18**, 385–397 (1995).
134. Brentjens, R. J. *et al.* Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood* **118**, 4817–4828 (2011).
135. Brentjens, R. *et al.* CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci. Transl. Med.* **5**, 177ra38 (2013).
136. Maude, S. L. *et al.* Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1507–1517 (2014).
137. Kochenderfer, J. N. *et al.* Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood* **116**, 4099–4102 (2010).
138. Kochenderfer, J. N. *et al.* B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood* **119**, 2709–2720 (2012).
139. Sauter, C. S. *et al.* Phase I trial of 19-28z chimeric antigen receptor modified T cells (19-28z CAR-T) post-high dose therapy and autologous stem cell transplant (HDT-ASCT) for relapsed and refractory (rel/ref) aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma (B-NHL). *J. Clin. Oncol.* **33**, (2015).

140. Garfall, A. L. *et al.* Chimeric Antigen Receptor T Cells against CD19 for Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* **373**, 1040–1047 (2015).
141. de Visser, K. E., Korets, L. V. & Coussens, L. M. De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell* **7**, 411–423 (2005).
142. Ammirante, M., Luo, J.-L., Grivnickov, S., Nedospasov, S. & Karin, M. B-cell-derived lymphotoxin promotes castration-resistant prostate cancer. *Nature* **464**, 302–305 (2010).
143. Balkwill, F., Montfort, A. & Capasso, M. B regulatory cells in cancer. *Trends Immunol.* **34**, 169–173 (2013).
144. Ronson, A., Tivito, A. & Rowe, J. M. Treatment of Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults. *Curr. Oncol. Rep.* **18**, (2016).
145. Morgan, R. A. *et al.* Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **18**, 843–851 (2010).
146. Greish, K. Enhanced permeability and retention (EPR) effect for anticancer nanomedicine drug targeting. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **624**, 25–37 (2010).
147. Rahir, G. & Moser, M. Tumor microenvironment and lymphocyte infiltration. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **61**, 751–759 (2012).
148. Slaney, C. Y., Kershaw, M. H. & Darcy, P. K. Trafficking of T cells into tumors. *Cancer Res.* **74**, 7168–7174 (2014).
149. Karin, N. & Wildbaum, G. The Role of Chemokines in Shaping the Balance Between CD4+ T Cell Subsets and Its Therapeutic Implications in Autoimmune and Cancer Diseases. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
150. Adusumilli, P. S. *et al.* Regional delivery of mesothelin-targeted CAR T cell therapy generates potent and long-lasting CD4-dependent tumor immunity. *Sci. Transl. Med.* **6**, 261ra151 (2014).
151. Chmielewski, M., Kopecky, C., Hombach, A. A. & Abken, H. IL-12 release by engineered T cells expressing chimeric antigen receptors can effectively Muster an antigen-independent macrophage response on tumor cells that have shut down tumor antigen expression. *Cancer Res.* **71**, 5697–5706 (2011).
152. Gajewski, T. F. *et al.* Immune resistance orchestrated by the tumor microenvironment. *Immunol. Rev.* **213**, 131–145 (2006).
153. Lack of B7 expression, not human leukocyte antigen expression, facilitates immune

evasion by human malignant gliomas (PDF Download Available). *ResearchGate* Available at:

https://www.researchgate.net/publication/6298585_Lack_of_B7_expression_not_human_leukocyte_antigen_expression_facilitates_immune_evasion_by_human_malignant_gliomas.

(consulté le 10 mars 2017)

154. Tewalt, E. F. *et al.* Lymphatic endothelial cells induce tolerance via PD-L1 and lack of costimulation leading to high-level PD-1 expression on CD8 T cells. *Blood* **120**, 4772–4782 (2012).

155. Prosser, M. E., Brown, C. E., Shami, A. F., Forman, S. J. & Jensen, M. C. Tumor PD-L1 co-stimulates primary human CD8(+) cytotoxic T cells modified to express a PD1:CD28 chimeric receptor. *Mol. Immunol.* **51**, 263–272 (2012).

156. Hillerdal, V. & Essand, M. Chimeric Antigen Receptor-Engineered T Cells for the Treatment of Metastatic Prostate Cancer. *Biodrugs* **29**, 75–89 (2015).

157. Posey, A. D. *et al.* Engineered CAR T Cells Targeting the Cancer-Associated Tn-Glycoform of the Membrane Mucin MUC1 Control Adenocarcinoma. *Immunity* **44**, 1444–1454 (2016).

NOM et Prénom : GARDAN QUENTIN

TITRE DE LA THESE

Un méa lymphocyte T Pour une thérapie
médicamenteuse nouvelle de demain "en Pair ou Rialti"

- 9 OCT. 2017

Rennes, le

27/09/2017

Le Président de thèse :

A. FAÏLI

Le Directeur de thèse :

A. FAÏLI

VU et Permis d'imprimer

Le Président de l'Université de Rennes1.

D. ALIS
D'ALIS

GARDAN Quentin- Un néolymphocyte T pour une thérapie médicamenteuse nouvelle : « Espoir et réalité »

128 feuilles., 26 illustrations, 7 tableaux, 30 cm.- Thèse : Pharmacie ; Rennes 1; 2017 ; N° .

Le traitement du cancer est devenu un enjeu de santé publique. L'essor de l'immunothérapie a permis d'augmenter la survie des patients. L'une des armes actuellement plébiscitées est la thérapie cellulaire adaptative à base de lymphocyte T. Le Lymphocyte T est modifié génétiquement pour exprimer un récepteur d'antigène chimérique qui se lie aux cellules cancéreuses entraînant la mort de cette dernière. La thérapie de CAR-T cell est à l'étude dans de nombreux essais cliniques et les résultats les plus spectaculaires furent observés dans les hémopathies malignes.

Cancer treatment became a public health issue. The development of immunotherapy has increased of patient's survival rate. Currently, adaptive cell therapy based on T cell is the most used one. T Cell is engineered a chimeric antigen receptor who binds to cancer cells causing the death of the cell. CART cell therapy is being studied in several clinical trials and the most encouraging results have been observed in haematological diseases.

Rubrique de classement : Cancérologie

Mots-clés: Immunothérapie cancer, lymphocyte T, récepteur d'antigène chimérique, CAR-T cell

Mots-clés anglais MeSH : Immunotherapie, cancer, CAR-T cell

Président : Monsieur le Professeur Ahmad Faili

JURY : Assesseurs : Mme la Maitre de conférence Sarah Dion

Mme la Docteur Noëlle Davoust