



HAL
open science

Le développement des CAR-T cells dans le traitement de l'adénocarcinome pancréatique : quels challenges cliniques et réglementaires ?

Jihane Arbouhi

► **To cite this version:**

Jihane Arbouhi. Le développement des CAR-T cells dans le traitement de l'adénocarcinome pancréatique : quels challenges cliniques et réglementaires ?. Sciences pharmaceutiques. 2023. dumas-04152491

HAL Id: dumas-04152491

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04152491v1>

Submitted on 5 Jul 2023

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

THESE

PRÉSENTÉE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE DEVANT LA FACULTÉ DE
PHARMACIE DE MARSEILLE

LE 29 JUIN 2023

PAR

Mme ARBOUHI Jihane

Née le 08 Novembre 1997 à BASTIA

EN VUE D'OBTENIR

LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

TITRE :

**Le développement des CAR-T cells dans le traitement de l'adénocarcinome
pancréatique :
Quels challenges cliniques et réglementaires ?**

JURY :

Président : **Professeur Joseph CICCOLINI**, Laboratoire de Toxicocinétique Pharmacocinétique, Faculté de Pharmacie, Marseille

Membres : **Docteur Véronique ANDRIEU**, Laboratoire de Pharmacie galénique, Faculté de Pharmacie, Marseille

Docteur Jérémie MAGALON, Laboratoire de Culture et Thérapie Cellulaire, Faculté de Pharmacie, Marseille

Docteur David-Alexander ABITTAN, Pharmacien, Paris

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

<i>Doyen :</i>	M. Jean-Paul BORG
<i>Vice-Doyens :</i>	Mme Florence SABATIER-MALATERRE, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT, Mme Alexandrine BERTAUD
<i>Chargés de Mission :</i>	Mme Pascale BARBIER, Mme Alexandrine BERTAUD, M. David BERGELFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, M. Philippe GARRIGUE, M. Guillaume HACHE, M. Thierry TERME
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE, Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Patrice VANELLE, M. Pierre TIMON-DAVID,
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Philippe CHARPIOT, M. Riad ELIAS
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Sylvie BUREAU
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Manon BONIFAY
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Nathalie BESNARD

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC M. François DEVRED
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE	Mme Odile RIMET-GASPARINI Mme Pascale BARBIER Mme Manon CARRE M. Gilles BREUZARD Mme Alessandra PAGANO
GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE	M. Eric SEREE-PACHA Mme Véronique REY-BOURGAREL
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Pierre REBOUILLON M. Emmanuel CAUTURE Mme Véronique ANDRIEU Mme Marie-Pierre SAVELLI
BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE ET BIOTHERAPIES PHARMACO ECONOMIE, E-SANTE	M. Jérémy MAGALON Mme Carole SIANI Mme Muriel MASI

ENSEIGNANT CDI

ANGLAIS	Mme Angélique GOODWIN
---------	-----------------------

A.H.U.

PHARMACOTECHNIE	Mme Mélanie VELIER
-----------------	--------------------

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Françoise DIGNAT-GEORGE

PROFESSEURS

BIOLOGIE CELLULAIRE	M. Jean-Paul BORG
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE Mme Laurence CAMOIN-JAU Mme Florence SABATIER-MALATERRE Mme Nathalie BARDIN M. Romaric LACROIX
MICROBIOLOGIE	M. Jean-Marc ROLAIN M. Philippe COLSON
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN Mme Sandra GHAYAD
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Aurélie LEROYER Mme Sylvie COINTE
MICROBIOLOGIE	Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU Mme Alexandra WALTON

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Amandine BONIFAY
----------------------------	----------------------

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

PRATIQUE OFFICINALE	M. Jérôme JOUVE Mme Emmanuelle TONNEAU-PFUG
---------------------	--

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC
CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE	Mme Sok Siya BUN

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTO GAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL M. Quentin ALBERT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS M. Charles DESMARCHELIER M. Mathieu CERINO
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Duje BURIC M. Pascal PRINDERRE
CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE	Mme Sandrine ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE Mme Fanny MATHIAS
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE	Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme Béatrice BAGHDIKIAN M. Elnur GARAYEV

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	Mme Haïfa LAYACHI RAHABI M. Cyril PUJOL
DROIT ET ETHIQUE	Mme Laurie PAHUS
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA
DISPOSITIFS MEDICAUX	Mme Valerie MINETTI-GUIDONI

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Bruno LACARELLE M. Joseph CICCOLINI
TOXICOLOGIE GENERALE	Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACIE CLINIQUE	M. Florian CORREARD Mme Marie-Anne ESTEVE
PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET
PHYSIOLOGIE / PHARMACOLOGIE	Mme Anaïs MOYON
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA Mme Anne RODALLEC M. Nicolas FABRESSE
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Pierre-Henri VILLARD

A.H.U.

PHYSIOLOGIE / PHARMACOLOGIE	M. Vincent NAIL
PHARMACIE CLINIQUE	Mme Maeva MONTALEYTANG Mme Charlotte BERARD

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Annie CILIA, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Yann COTTE, Pharmacien Assistant
M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Nicole FRANCOIS, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire
Mme Céline HIRSCH, Pharmacien Conseil de l'Assurance Maladie
Mme Christelle LABRANDE, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Florence LEANDRO-DIJON, Pharmacien adjoint
Mme Nathalie MARTIN, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Sophie MERLIN, Pharmacien Assistant
Mme Vanessa METZ, Pharmacien hospitalier
Mme Alice PERINEAU, Pharmacien Assistant
Mme Florence PEYRON, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire
M. Bertrand POURROY, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché
M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier
M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 23 février 2023

« L'UNIVERSITE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION AUX
OPINIONS EMISES DANS LES THESES. CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME
PROPRES A LEURS AUTEURS »

Remerciements

Je tiens à remercier les membres de mon jury pour leur présence et le temps que vous avez pu m'accorder à la réalisation de ce travail qui marque la fin de mon parcours universitaire.

Professeur CICCOLINI Joseph, merci d'avoir accepté d'être le président de mon jury, merci pour votre disponibilité et vos précieux enseignements durant toutes ces années de pharmacie.

Docteur ANDRIEU Véronique, merci pour votre relecture et vos judicieux conseils qui m'ont permis mener à terme ce travail.

Docteur MAGALON Jeremy, merci à vous d'avoir encadré la rédaction de mon manuscrit. Merci également pour le temps que vous avez pu m'accorder. Vos précieux conseils m'ont été d'une grande aide pour améliorer mon travail et ma réflexion.

Docteur ABITTAN David-Alexander, merci d'avoir accepté d'être membre de mon jury et pour tes conseils quotidiens afin d'être un pharmacien exemplaire.

Ensuite, je souhaite remercier les membres de ma famille, particulièrement mes parents Fatima et Saddik vous m'avez été d'un soutien sans faille dans tous ce que j'entreprends. Merci pour votre confiance et vos encouragements. Merci à toi papa de m'avoir transmis cet esprit d'entrepreneur. Merci à mon frère et ma sœur de m'avoir soutenu à chaque étape de mon parcours universitaire toujours dans la bonne humeur.

Merci à mes amis pharmaciens sans qui ces années universitaires n'auraient pas eu la même saveur. Merci à Selma et Nita pour toutes les années riches en expériences passés à vos côtés.

Merci à Yasmine, ma pharmacienne biologiste, pour ton amitié sans faille depuis la L2. Merci à Kamelya, mon expatriée luxembourgeoise qui a su me montrer que l'impossible pouvait être possible.

Merci à Hadjer une titulaire plus qu'accomplie, un rayon de soleil marseillais. Merci à Asmaa, Nawel et Hajar pour les personnes formidables que vous êtes. Merci à Tania pour ta présence lors de chaque épreuve importante de notre cursus.

Merci à mes amis non-pharmaciens qui ont toujours répondu présent pendant ces longues années d'études. Merci à Maître KOHEN pour ton soutien quotidien et ton analyse juridique rigoureuse pour mettre en lumière le meilleur de moi-même.

Merci à tous ceux que je n'ai pas cité et qui ont impacté mon parcours universitaire et professionnel.

Table des matières

Remerciements	9
Table des figures	14
Table des tableaux	15
Abréviations	16
INTRODUCTION	19
1. La maladie	20
A. Caractéristiques générales de l'adénocarcinome pancréatique	20
1. Définition.....	20
2. Structure.....	20
B. Épidémiologie	22
C. Physiopathologie	23
1. Altérations géniques et facteurs de croissance.....	23
2. Lésions précancéreuses pancréatiques	26
2.1. Néoplasie pancréatique intraépithéliale (PanIN)	26
2.2. Néoplasme muqueux papillaire intracanalair (IPMN)	27
2.3. Néoplasme tubulopapillaire intracanalair (ITPN)	28
2.4. Néoplasme mucineux kystique (MCN)	29
3. Lésions cancéreuses invasives.....	29
D. Dépistage, Diagnostic et traitements disponibles	32
1. Dépistage et diagnostic de l'adénocarcinome pancréatique	32
1.1. Bilan initial.....	33
1.2. Bilan d'extension	34
2. Prise en charge des formes localisées (stades I à III).....	35
2.1. Tumeur résécable.....	36
2.2. Tumeur borderline ou localement avancée	38
2.3. Tumeur localement avancée	38
3. Formes métastatiques (stade IV)	39
4. Besoin médical	40

2. Stratégie de développement des CAR-T cells.....	41
A. Développement des CAR-T Cells	41
1. Développement pré-clinique.....	41
2. Cadre réglementaire des essais pré-cliniques :	41
3. Cadre réglementaire des essais cliniques.....	42
B. Autorisations préalables	44
1. Demande d’essai clinique : CTA – EMA	44
2. Demande d’essai clinique : IND – FDA	45
C. Fabrication	46
1. Généralités	46
2. Cellules T transduites	48
3. Production et distribution	50
3.1. Étape d’acheminement du produit	50
3.2. Stockage	51
3.3. Packaging & labelling.....	51
D. Principaux défis de la technologie des CAR-T	52
1. Contexte	52
2. Les défis cliniques.....	52
2.1. Surmonter les défis de fabrication des cellules CAR-T.....	52
2.2. Réplicabilité de la production des CAR-T	54
2.3. Sélection des cibles pour maximiser l'effet et minimiser la toxicité	54
2.4. Toxicité	55
2.5. Contrôle in vivo	56
3. Les défis réglementaires.....	58
3.1. Répartition UE et US.....	58
3.2. Réglementation au sein de l’UE	59
3.3. Normes de production et distribution	60
3. Développement en cours des CAR-T cells ciblant le cancer du pancréas	62
A. Contexte	62
B. Cible d’action	63
1. CEACAM7, nouvelle cible	63
2. Expression des protéines de la famille CEA.....	63

C. Essai clinique	65
1. Matériel.....	65
1.1. Sang humain primaire et cellules dérivées du cancer.....	65
2. Méthodes.....	65
2.1 Cytométrie en flux.....	65
2.2 Essais de cytotoxicité.....	66
2.3 Expériences in vivo.....	66
2.4 Immunohistochimie.....	66
2.5 Génération de cellules CAR-T.....	67
D. Résultats	67
1. Immunocoloration.....	67
2. Génération de cellules CAR-T dérivées de 2869.....	71
3. Activité spécifique des cellules 2869 CAR-T contre les cibles exprimant CEACAM7.....	73
4. Activité in vivo des cellules 2869 CAR-T contre les xénogreffes exprimant CEACAM7.....	77
CONCLUSION	79
Bibliographie	81
SERMENT DE GALIEN	93

Table des figures

FIGURE 1: STRUCTURE DU PANCREAS	20
FIGURE 2 :SCHEMA DES CELLULES ACINEUSES ET DES ILOTS DE LANGERHANS.....	21
FIGURE 3 :DIAGRAMME DE L'INCIDENCE DU CANCER DU PANCREAS DANS LE MONDE EN FONCTION DU SEXE.....	23
FIGURE 4 :REGULATION DE HIF-1 α EN CONDITION NORMALE ET SOUS HYPOXIE	25
FIGURE 5 :NEOPLASIE PANCREATIQUE INTRAEPITHELIALE DE FAIBLE (A) ET HAUT GRADE (B)	27
FIGURE 6 :SOUS-TYPES D'IPMN PANCREATOBILIAIRE (E) ET ONCOCYTIQUE (F)	27
FIGURE 7 :NEOPLASME TUBULOPAPILLAIRE INTRACANALAIRE AU MICROSCOPE (x200)	28
FIGURE 8 :NEOPLASME MUCINEUX KYSTIQUE BAS (I) ET HAUT GRADE (J)	29
FIGURE 9 :CARACTERISTIQUES CYTOLOGIQUE DE L'ADENOCARCINOME CANALAIRE PANCREATIQUE	30
FIGURE 10 :CELLULES PEU DIFFERENCIEES DE L'ADENOCARCINOME CANALAIRE PANCREATIQUE	30
FIGURE 11 : ÉTAPES DU PROTOCOLE FOLFIRINOX	37
FIGURE 12 : PRODUCTION DES CAR-T CELLS	48
FIGURE 13 : ÉTAPES DE FABRICATION DES CAR-T CELLS.....	49
FIGURE 14: ÉTAPES D'ACHEMINEMENT DES CAR-T CELLS (49)	50
FIGURE 15 : CONTROLE IN VIVO DES CAR-T CELLS VIA UNE PETITE MOLECULE BIFONCTIONNELLE.....	56
FIGURE 16: CONCEPTION DES CAR-T CELLS ACTIVES PAR LE BIAIS DE MODULES DE SIGNALISATION CLES	57
FIGURE 17: REPARTITION DES ESSAIS CAR-T DANS LE MONDE.....	58
FIGURE 18 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DOUZE MEMBRES DE LA FAMILLE DES MOLECULES D'ADHESION CELLULAIRE LIEES A L'ANTIGENE CARCINOEMBRYONNAIRE HUMAIN.....	64
FIGURE 19 : EXPRESSION DE CEACAM7 DANS PDAC	69
FIGURE 20 : DEVELOPPEMENT DE CAR-T CELLS DERIVEES DE 2869	72
FIGURE 21 : EFFICACITE IN VITRO DES CELLULES 2869 CAR-T.....	74
FIGURE 22 : EFFICACITE IN VIVO DES CELLULES 2869 CAR-T	76
FIGURE 23 : LES CELLULES CAR-T CIBLANT LES TUMEURS XENOGREFFES DISSEMINÉES IN VIVO	78

Table des tableaux

TABLEAU 1 : LISTE DES CELLULES D'UN ILOT DE LANGERHANS ASSOCIEE A LEUR HORMONE ENDOCRINE.....	22
TABLEAU 2 : T-TUMEUR PRIMITIVE.....	31
TABLEAU 3 : N- ADENOPATHIES REGIONALES.....	31
TABLEAU 4 : M-METASTASES.....	32
TABLEAU 5 : GROUPEMENT PAR STADES	32
TABLEAU 6 : EXAMEN REALISES DANS LE CADRE D'UN BILAN INITIAL	33
TABLEAU 7 : EXAMENS REALISES DANS LE CADRE D'UN BILAN D'EXTENSION	35

Abréviations

ATMP : Advanced Therapy Medicinal Product

BPD : Bonnes Pratiques de Distribution

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

BPL : Bonnes Pratiques de Laboratoire

CARAT : Chimeric Antigen Receptor of Advanced Therapies

CAR-T : Chimeric Antigenic Receptor -T

CBER : Center of Biologics Evaluation and Research

CEA: Antigènes Carcinoembryonnaires

CE : Conseil Européen

CMC : Chemistry Manufacturing and Controls

CMH: Commission pour les Médicaments à usage Humain

CRS : Cytokine Release Syndrome

CSC: Cellules Souches Cancéreuses

CTA : Clinical Trial Application

CTC: Cellules Tumoraes Circulantes

CTIS : Clinical Trial Information System

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole

DPC4 : Deleted in Pancreatic Cancer

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic Acid

EEE: Espace Economique Européen

EGF: Epidermal Growth Factor

EMA: European Medicines Agency

EPI: Equipment de Protection Individuelle

FBS: Fraction de Sang Foetale de vache

FDA: Food and Drug Administration

FGF: Fibroblast Growth Factor

FITC : Isothiocyanate de Fluorescéine

GFP: Green Fluorescent Protein

GMP: Good Manufacturing Practices
GPI: Glycosylphosphatidylinositol
HIF : Hypoxia Inducible Factor
HRE : Hypoxia-Response Element
ICH : International Conference Harmonization
IL: Interleukine
IND: Investigational New Drug
IPMN : Néoplasme Muqueux Papillaire Intra-canalair
IRM : Imagerie par résonance magnétique
ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITPN : Néoplasme Tubulopapillaire Intra-canalair
K-ras : Kirsten RAS
LTR : Long Terminal Repeat Sequence
MCN : Néoplasme Mucineux Kystique
MEC : Matrice Extra-cellulaire
MFI : Intensité de Fluorescence Médiane
MTI : Médicament de Thérapie Innovante
NGF: Nerve Growth Factor
OCDE: Organisation de Coopération et de Développement Economique
OGM : Organismes Génétiquement Modifiés
PanIN : Néoplasie Pancréatique Intraépithéliale
PBS : Sulfure de Plomb
PDCA : Adénocarcinome Canalair Pancréatique
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
PDX : Xénogreffes Dérivées de Patients
PHD : Prolyl-Hydroxylases
PIK3CA : Phosphatidylinositol 3-kinase AKT
PRIME : Priority Medicines
pVHL :Protéine von Hippel-Lindau
TCR : Récepteurs de cellules T

TDM : Tomodensitométrie

TEP : Tomographie par émission de positons

TLS : Syndrome de Lyse Tumorale

TME : Microenvironnement Tumorale

TNE : Tumeur Neuroendocrine

TNM : Tumeur Nodes Métastases

UE : Union Européenne

VHP : Procédure d'Harmonisation Volontaire

WST : Western- Bolt

INTRODUCTION

Le cancer du pancréas représente 495 773 nouveaux cas dont 466 003 décès en 2020 à l'échelle mondiale, selon les statistiques mondiales du cancer. Il s'agit d'une maladie mortelle se plaçant au dernier rang en termes de pronostic vital parmi les différents cancers avec un taux d'incidence proche du taux de mortalité. A noter que 95% des cancers du pancréas sont des adénocarcinomes pancréatiques, présents à des stades avancés ce qui donne lieu à de faibles taux de survie allant de 2 à 9% au bout de cinq ans (1).

La prévention ou le diagnostic précoce sont des facteurs importants pour améliorer la prise en charge de la maladie. De nouvelles techniques chirurgicales et thérapeutiques apparaissent mais ces dernières n'ont apporté aucun résultat satisfaisant au cours des dernières années (2). La thérapie génique dans le traitement des patients atteints d'adénocarcinome pancréatique pourrait être un espoir. En effet l'utilisation de CAR-T cells est très prometteuse. Il s'agit de cellules T porteuses de récepteurs chimériques qui ont montré des résultats positifs dans de nombreux cancers hématologiques réfractaires. Les progrès apportés dans la prise en charge des lymphomes sont également transposables aux tumeurs solides.

Cependant, bien que cette technique soit prometteuse, les barrières biologiques, l'hétérogénéité tumorale et les propriétés immunosuppressives du microenvironnement sont des éléments importants à prendre en compte. L'ajout d'inhibiteurs de points de contrôle immunitaire ou d'autres agents ciblant soit la cellule cancéreuse ou l'environnement tumoral permettra d'améliorer les résultats thérapeutiques (3). Nous verrons dans un premier temps les améliorations cliniques qui peuvent être apportées.

L'environnement réglementaire étant complexe pour les médicaments de thérapie innovante, nous aborderons les points clés à améliorer afin de faciliter l'évaluation des CAR-T cells. Enfin nous mettrons en lumière la découverte d'une nouvelle cible d'action prometteuse dans le traitement de l'adénocarcinome pancréatique canalaire. Il s'agit d'un antigène cible spécifique pour les CAR-T cells, CEACAM7.

1. La maladie

A. Caractéristiques générales de l'adénocarcinome pancréatique

1. Définition

Le terme de “cancer du pancréas” désigne principalement l'adénocarcinome pancréatique compte tenu de l'incidence élevée de ce dernier. En effet, il existe deux types de cancers au niveau du pancréas. L'adénocarcinome pancréatique représente à lui seul 95% des cancers du pancréas, il s'agit d'une tumeur exocrine qui débute dans les cellules exocrines de l'organe. Les cellules exocrines se situant au niveau des canaux pancréatiques, la désignation précise est donc l'adénocarcinome canalaire pancréatique. Les tumeurs neuroendocrines (TNE), représentent quant à elles 5% des cancers du pancréas, affectant les cellules des îlots de Langerhans. Il existe de nombreux sous-types de TNE (4,5).

2. Structure

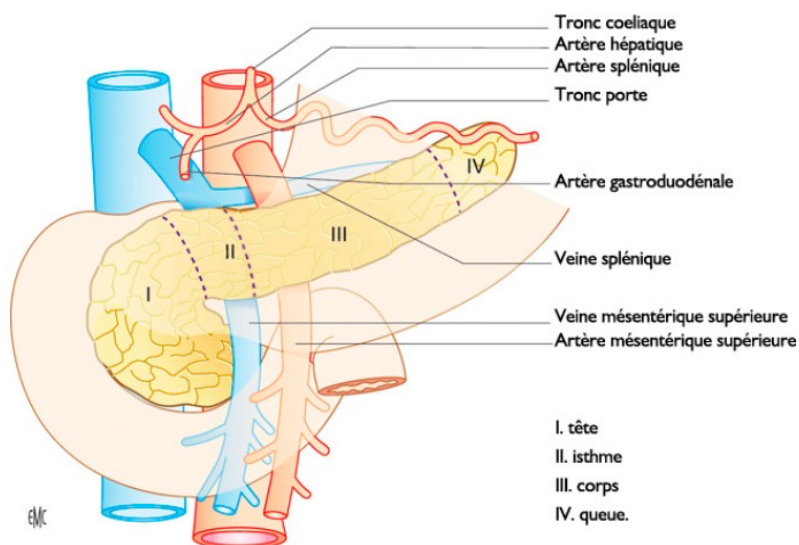


Figure 1 : Structure du pancréas

Le pancréas est une glande rétropéritonéale située au niveau supérieur de l'abdomen. Elle possède une longueur d'environ 15cm et pèse en moyenne 100g. Cet organe est divisé en différentes parties ; près du duodénum se trouve la tête puis le corps et la queue.

Le pancréas est vital de par sa liaison avec de nombreux organes dont la rate, l'estomac, le duodénum et le côlon. La vascularisation artérielle du pancréas naît à partir du tronc cœliaque ou de l'artère mésentérique supérieure. Les veines vont quant à elles se décharger dans le tronc porte ou la veine mésentérique supérieure (6) (7).

Il s'agit d'une glande amphicrine c'est-à-dire qu'elle possède à la fois une fonction exocrine et endocrine. Dans la fonction exocrine, ce sont les acinis qui vont être responsables de la production du suc pancréatique qui sera déversé dans le duodénum. Le suc pancréatique possède un pH basique. Environ 1 kg de suc pancréatique est produit par jour, celui-ci contient des proenzymes biosynthétisées par les cellules acineuses et des ions bicarbonates. Le bicarbonate étant amphotère, il va donc jouer le rôle de tampon et neutraliser l'acidité au niveau du duodénum. Cette caractéristique est importante car la majorité des enzymes pancréatiques et intestinales sont inactives en milieu acide.

Chaque acinus est composé de cellules acineuses pyramidales orientées (acinis), dont les membranes apicales tapissent une lumière centrale appelée canalicule intercellulaire. Les sécrétions cellulaires acineuses s'écoulent dans cette lumière centrale, qui se compose de cellules épithéliales canalaire et sécrétant du bicarbonate, principalement sous forme de bicarbonate de sodium. Les canaux qui drainent les acinis convergent vers de plus grands canaux intralobulaires, qui se transforment ensuite en canaux extralobulaires majeurs. Les conduits extralobulaires convergent finalement vers un canal collecteur principal, qui se joint au conduit pancréatique commun (canal de Wirsung) avant le canal biliaire (8).

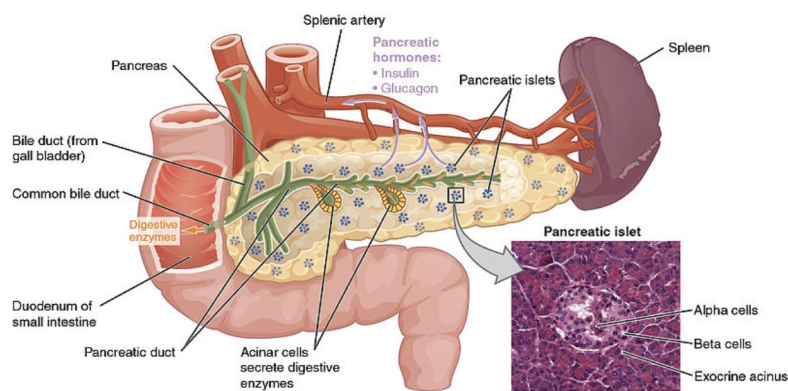


Figure 2 : Schéma des cellules acineuses et des îlots de Langerhans

Dans la fonction endocrine, ce sont les îlots de Langerhans qui vont synthétiser les hormones pancréatiques ayant différentes fonctions essentielles dans la régulation de la glycémie. Cette partie ne représente que 1% du pancréas mais étant très vascularisée, elle permet l'action des hormones sur les organes à distance une fois libérées dans le sang. Un îlot de langerhans est constitué de cinq cellules différentes qui vont être responsables de la production de différentes hormones. Ces différentes cellules sont répertoriées dans le tableau 1 ci-dessous avec leurs hormones respectives ainsi que leur action.

Tableau 1 : Liste des cellules d'un îlot de Langerhans associées à leur hormone endocrine

Cellule	Hormone synthétisée	Action
Alpha	Glucagon	Hyperglycémiante
Beta	Insuline	Hypoglycémiante
Delta	Somatostatine	Effet inhibiteur sur le Glucagon et l'Insuline
F	Polypeptides pancréatiques	Diminue la contraction de la vésicule biliaire et la sécrétion exocrine du pancréas
Epsilon	Ghréline	Stimule l'appétit

B. Épidémiologie

Le cancer du pancréas est aujourd'hui la 7^{ème} cause de mortalité par cancer dans le monde, touchant principalement les personnes âgées de plus de 55 ans. L'incidence de cette pathologie ne cesse de croître dans les pays développés où l'obésité et la consommation d'alcool augmentent considérablement. En effet, le taux d'incidence standardisé en fonction de l'âge est le plus élevé en Europe et Amérique du Nord, tandis que celui-ci est le plus bas en Afrique et en Asie Centrale du Sud.

Les hommes sont plus touchés que les femmes ; cependant dans les pays où l'indice de développement humain est élevé, cette différence entre les sexes a tendance à diminuer avec les modifications de style de vie. Le nombre de personnes atteintes risque de doubler en Europe et aux Etats-Unis d'ici 2030 (2).

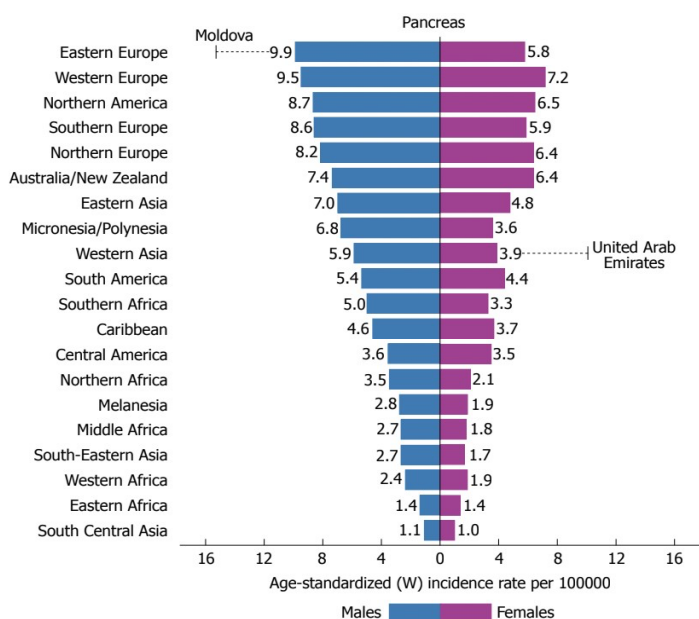


Figure 3 : Diagramme de l'incidence du cancer du pancréas dans le monde en fonction du sexe

En France, l'incidence de l'adénocarcinome pancréatique a triplé depuis 1997 et se place aujourd'hui au 3ème rang des cancers les plus mortels. Le sexe ratio hommes/femmes est de 1,48 reflétant une incidence plus élevée chez les hommes (9).

C. Physiopathologie

1. Altérations géniques et facteurs de croissance

L'adénocarcinome pancréatique présente un pronostic très mauvais qui se traduit par son agressivité histologique. Dans cette pathologie, nous retrouvons une importante altération génétique et une surexpression de plusieurs facteurs de croissance dans des études qui ont été réalisées en culture cellulaire ou sur des biopsies pancréatiques. Les principaux gènes suppresseurs de tumeurs altérés sont les gènes p16, TP53 et DPC4/smad4 (Deleted in Pancreatic Cancer).

Cette altération est suivie de l'activation de l'oncogène k-ras (Kirsten RAS) qui apparaît très tôt dans le processus de cancérisation à la suite d'une mutation ponctuelle sur le codon 12. Cette surexpression pourrait être une voie d'amélioration de la prise en charge de l'adénocarcinome pancréatique grâce à la mise en place d'un diagnostic précoce de la mutation du codon 12 (10). À la suite de l'atteinte génétique précoce, celle-ci sera suivie par une augmentation de l'activité télomérase donnant lieu à une surexpression de nombreux facteurs.

En effet, il est observé une forte expression des éléments moléculaires suivants :

- les facteurs de croissance et angiogénique et/ou
- leurs récepteurs et/ou
- leur système de transduction (NGF (Nerve Growth Factor), EGF, gastrine, bombésine, VEGF, FGF, PDGF),
- des facteurs d'invasion (métalloprotéinases, E-cadhérine, intégrine bêta, urokinase et l'activateur tissulaire du plasminogène).

Cette expansion contribue à la progression rapide du cancer et renforce son potentiel métastatique. La réaction stromale et la pauvreté de la néoangiogenèse définissent la résistance du cancer aux différents traitements par chimiothérapie. Le stroma correspond à des populations diverses de cellules normales d'origine mésenchymateuse, incluant des fibroblastes, des cellules endothéliales, des cellules inflammatoires (macrophages, neutrophiles, lymphocytes), des cellules souches mésenchymateuses et des préadipocytes/adipocytes qui sont inclus dans une MEC au tissu conjonctif, les vaisseaux, les leucocytes et la matrice extra-cellulaire qui entourent la cellule tumorale. Ainsi une réaction stromale importante permet à la tumeur de développer un tissu de soutien beaucoup plus enraciné, devenant ainsi moins réactif aux traitements. La néoangiogenèse étant faible, il y a donc très peu de nouveaux vaisseaux qui apparaissent à la suite de l'expansion de la tumeur (11).

La néoangiogenèse correspond à la formation de nouveaux vaisseaux par l'expansion de la tumeur. Celle-ci étant très faible dans notre cas, il y a donc très peu de nouveaux vaisseaux qui pourraient être la cible des traitements anti-angiogéniques.

Les traitements antiangiogéniques réduisent la formation des microvaisseaux et augmentent les zones nécrotiques, marqueurs indirects des régions hypoxiques au sein de la tumeur. Face à la faible vascularisation du stroma, les antiangiogéniques s'avèrent inefficaces et génèrent une résistance de la cellule tumorale par l'induction d'une hypoxie. L'apport insuffisant en oxygène va conduire à une reprogrammation métabolique complexe des cellules cancéreuses pour pallier leurs besoins excessifs en énergie et nutriments (12 - 14).

Les cellules tumorales vont donc s'adapter au stress hypoxique en stabilisant les facteurs de transcription induits par l'hypoxie, essentiellement HIF (hypoxia inducible factor)-1 α .

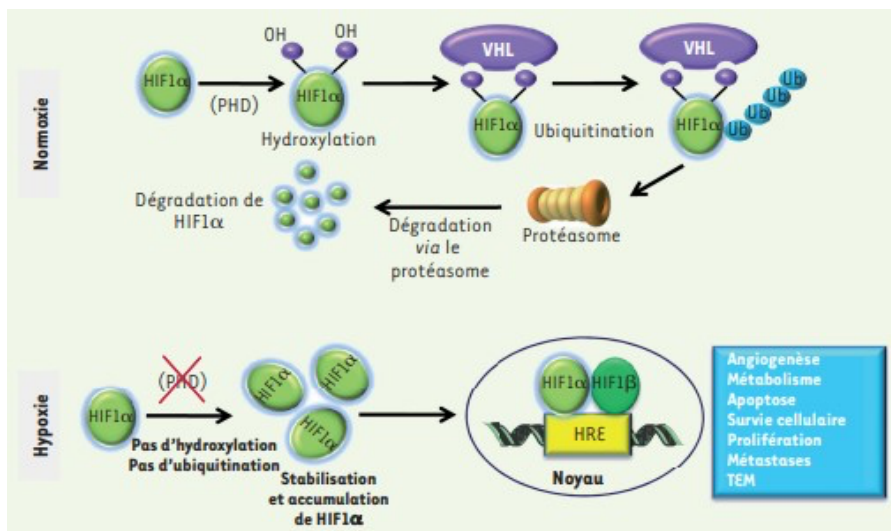


Figure 4 : Régulation de HIF-1 α en condition normale et sous hypoxie

En condition normale, HIF-1 α est hydroxylée par les prolyl-hydroxylases (PHD) ce qui va lui permettre d'interagir avec la protéine suppresseur de tumeur von Hippel-Lindau (pVHL). pVHL va ensuite recruter l'ubiquitine ligase E3 qui va catalyser la poly-ubiquitination de HIF-1 α et va conduire à la dégradation de HIF-1 α par le protéasome. Lorsque nous sommes en présence d'une hypoxie, les PHD sont inhibés, il n'y a donc pas d'hydroxylation possible, ni d'ubiquitination pouvant mener à une dégradation.

Ainsi, HIF-1 α reste stable, s'accumule et pénètre dans le noyau où elle est associée à HIF-1 β . Suite à cette association, elle va pouvoir exercer son activité transcriptionnelle en se liant aux séquences HRE (hypoxia-response element) présentes dans la région promotrice des gènes cibles.

2. Lésions précancéreuses pancréatiques

L'adénocarcinome canalaire pancréatique découle de nombreuses lésions non invasives qui peuvent être des lésions kystiques ou non. Une seule lésion non kystique existe : il s'agit de la néoplasie pancréatique intraépithéliale (PanIN). En ce qui concerne les lésions kystiques, il peut s'agir soit d'un néoplasme muqueux papillaire intracanalair (IPMN), un néoplasme tubulopapillaire intracanalair (ITPN) ou un néoplasme mucineux kystique (MCN).

Le diagnostic des lésions non-kystes est possible au microscope sur des échantillons de biopsie. Quant aux lésions kystiques, le diagnostic peut être établi seulement grâce à un examen radiologique.

Selon la classification de l'Organisation mondiale de la santé de 2010, les lésions précancéreuses sont divisées en trois catégories en fonction de la dysplasie. Les dysplasies sont des troubles acquis de l'homéostasie cellulaire résultant d'anomalies génétiques qui altèrent le contrôle de la prolifération et la maturation cellulaire. Cette dysplasie peut être présente faiblement, de façon modérée ou forte. Il a été mis en évidence que les lésions avec une dysplasie faible à modérée ont peu de risque de progresser tandis que celles ayant une forte dysplasie ont un fort pouvoir invasif (15).

2.1. Néoplasie pancréatique intraépithéliale (PanIN)

Les PanINs sont identifiés histologiquement comme de microscopiques lésions du canal pancréatique muqueux (<0,5 cm). Les lésions de faible grade englobent l'épithélium muqueux cylindrique avec des noyaux pâles à atypique, une stratification nucléaire et une hyperchromasie (Figure 5A).

Les lésions de grade élevé englobent les formations papillaires, micropapillaires ou cribriformes avec une sévère atypie nucléaire, une perte de polarité et des macro-nucléoles (Figure 5B).

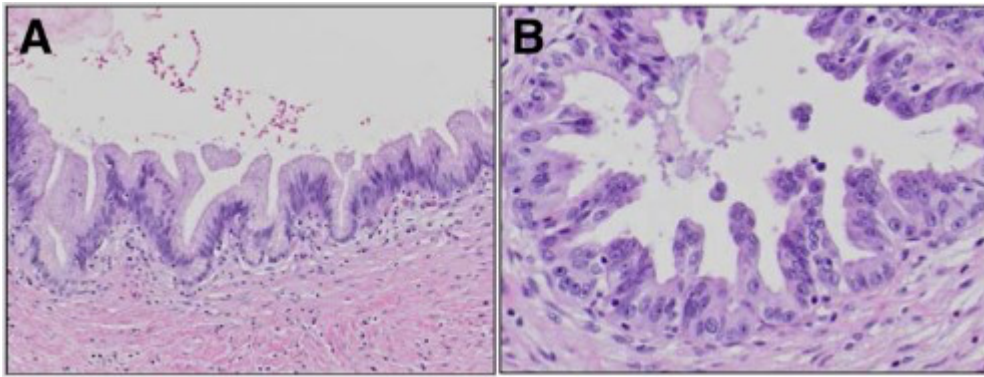


Figure 5 : Néoplasie pancréatique intraépithéliale de faible (A) et haut grade (B)

Ces lésions sont accompagnées de nombreuses mutations, avec tout d'abord un rétrécissement des télomères, l'activation de l'oncogène k-ras et une surexpression de HER-2 dans les PanIN de faible grade. Puis nous retrouvons une altération des gènes p16 et SMAD4 ainsi que la mutation de TP53 et BRCA2 dans les PanIN de haut grade.

2.2. Néoplasme muqueux papillaire intracanaux (IPMN)

Les IPMN sont des tumeurs kystiques (> 1cm) détectables par radiologie et communiquant avec le canal pancréatique. Les caractéristiques permettant de les identifier sont les lésions kystiques, l'invasion du système canalaux pancréatique, la dilatation du conduit pancréatique principal ou des conduits environnants ainsi que l'atrophie du parenchyme environnant. Les IPMN sont classés en sous-types dont le pancréatobiliaire (Figure 6E) et oncocytique (Figure 6F).

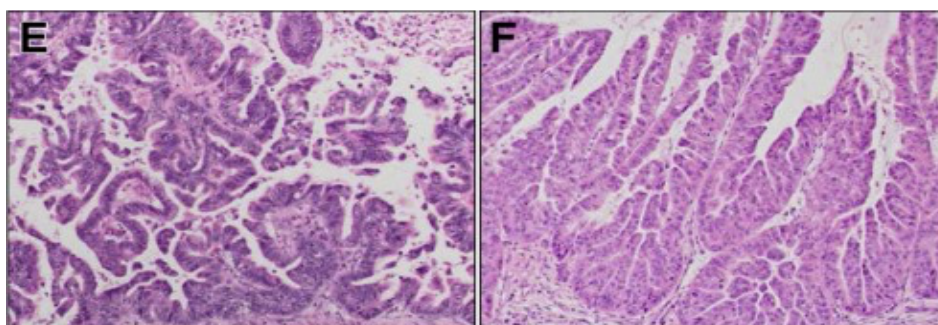


Figure 6 : Sous-types d'IPMN pancréatobiliaire (E) et oncocytique (F)

Les IPMN pancréatobiliaires possèdent des cellules avec une doublure néoplasique cubique contenant peu de mucine, un nucléole élargi et une architecture complexe. Les IPMN oncocytiques présentent des cellules néoplasiques éosinophiles, une arborescence papillaire et une lumière intraépithéliale. Suivant la classification internationale des lésions précancéreuses, les changements cytologiques d'un grade faible à élevé sont comparables à ceux retrouvés dans les PanIN. En effet, on retrouve une architecture plus complexe, irrégulière et hyperchromatique des noyaux au sein des IPMN de haut grade.

De nombreuses mutations peuvent prédire la transformation de la lésion IPMN en un carcinome invasif dont l'inactivation simultanée des gènes TP53 et CDKN2A.

2.3. Néoplasme tubulopapillaire intracanalair (ITPN)

Les ITPN sont des lésions macroscopiques (≥ 1 cm) intracanalaires, formant des masses épithéliales tubulaires à forte dysplasie. Ils sont composés de tubules très compacts, cribriformes et possédant très peu de mucine. (Figure 7)

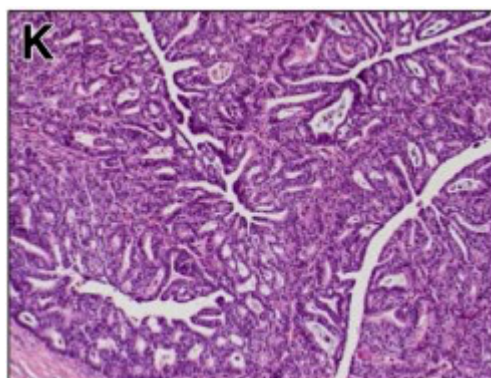


Figure 7 : Néoplasme tubulopapillaire intracanalair au microscope (x200)

Contrairement aux IPMN dans lesquels la mutation de l'oncogène k-ras est la plus commune, dans le cas des ITPN nous retrouvons plus fréquemment la mutation du gène PIK3CA (phosphatidylinositol 3-kinase AKT). L'activation de l'oncogène PIK3CA est donc une mutation spécifique des néoplasmes tubulopapillaires intracanalaires.

2.4. Néoplasme mucineux kystique (MCN)

Les MCN sont différents des autres lésions car ils ne communiquent pas avec le système de conduits pancréatiques. De ce fait, il n'y aura pas de symptômes révélateurs de l'atteinte du pancréas qui peuvent être présents sous forme de pancréatite, jaunisse ou diabète. La lésion est représentée sous forme d'un kyste multiloculaire avec une capsule fibrotique et un stroma de type ovarien.

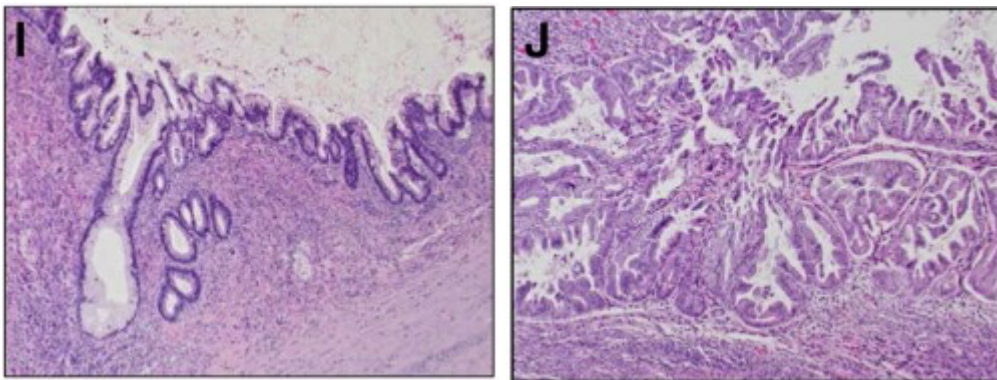


Figure 8 : Néoplasme mucineux kystique bas (I) et haut grade (J)

Les mutations génétiques sont quant à elles identiques aux autres lésions avec une altération des gènes k-ras, TP53 et CDKN2A. Il n'y a pas de mutation spécifique aux MCN.

3. Lésions cancéreuses invasives

L'accumulation des lésions précancéreuses énoncées précédemment conduit à l'apparition de lésions cancéreuses invasives. Ces formations malignes sont essentiellement retrouvées au niveau de la tête du pancréas (environ 70%) et représentent une faible partie dans le corps et la queue de la glande (environ 10% et 15% respectivement).

Afin de poser un diagnostic d'adénocarcinome pancréatique canalaire, il faut différencier les lésions malignes des lésions bénignes. Seule une analyse cytologique permettra de distinguer ces deux lésions.

L'adénocarcinome pancréatique est caractérisé cytologiquement par un pléomorphisme nucléaire, une hyperchromasie, la présence de macronucléoles, un rapport nucléaire/cytoplasmique élevé, un chevauchement nucléaire et des membranes nucléaires irrégulières (Figure 9).

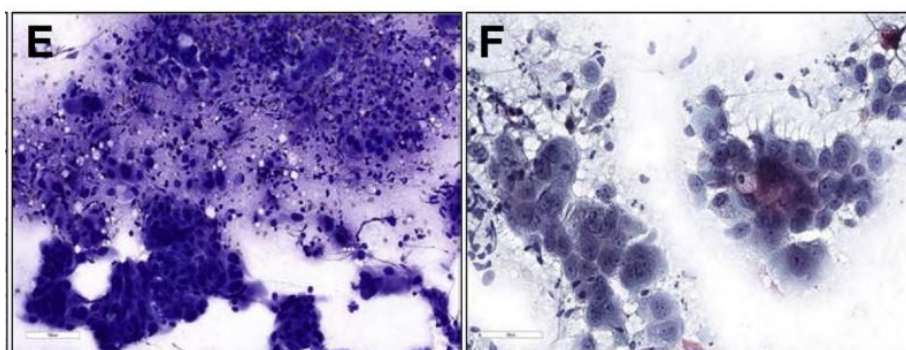


Figure 9 : Caractéristiques cytologiques de l'adénocarcinome canalaire pancréatique

Les grades élevés d'adénocarcinome ont des caractéristiques plus marquées. En effet, les cellules tumorales bien différenciées ont moins de pléomorphisme nucléaire, un faible rapport nucléaire/cytoplasmique, et une mucine intracellulaire abondante. Les cellules sont disposées de façon désorganisée et ne sont pas uniformément espacées. (Figure 10)

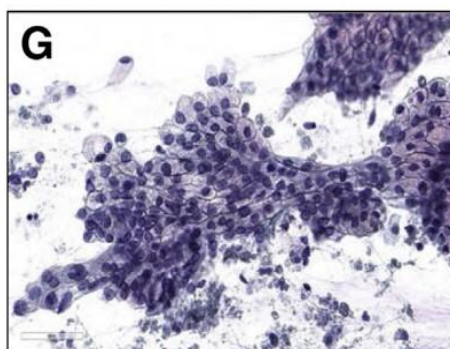


Figure 10 : Cellules peu différenciées de l'adénocarcinome canalaire pancréatique

Au niveau des mutations génétiques, il n'y a pas de marqueur spécifique qui permettrait de distinguer une formation maligne. Ainsi des essais cliniques sont développés afin de définir les mutations spécifiques à l'adénocarcinome pancréatique. Le microenvironnement joue un rôle important car il a été mis en évidence qu'un taux élevé de regulatory T cell/CD4p est un facteur pronostic de faible survie (15).

Le pronostic post-résection des patients atteints de l'adénocarcinome canalaire pancréatique est principalement déterminé par l'étendue anatomique de la maladie, telle que définie par la 8^{ème} édition de stadification TNM de 2017 (16). (Tableaux 2-3-4-5) La classification s'applique aux carcinomes du pancréas exocrine et aux carcinomes neuroendocrines de haut grade. La maladie doit être confirmée histologiquement ou par cytologie.

Tableau 2 : T-Tumeur primitive

Tis	Carcinome in situ
T1	$T \leq 2$ cm
T1a	$T \leq 0,5$ cm
T1b	$0,5 \text{ cm} < T < 1$ cm
T1c	$1 \text{ cm} < T \leq 2$ cm
T2	$2 \text{ cm} < T \leq 4$ cm
T3	$T > 4$ cm
T4	Tumeur étendue à l'axe cœliaque, à l'artère mésentérique supérieure et/ou à l'artère hépatique commune

Tableau 3 : N- Adénopathies régionales

N0	Pas de métastase ganglionnaire régionale
N1	Envahissement de 1 à 3 ganglions lymphatiques régionaux
N2	Envahissement ≥ 4 ganglions lymphatiques régionaux

Les ganglions lymphatiques régionaux dépendent du site tumoral. Les ganglions lymphatiques régionaux pour les tumeurs de la tête et de l'isthme sont présents le long du canal cholédoque, de l'artère hépatique commune, de la veine porte, des veines pyloriques, infra-pyloriques,

sous-pyloriques, mésentériques proximaux, cœliaques, antérieurs ou postérieurs aux vaisseaux pancréatico-duodénaux, et le long de la veine mésentérique supérieure et du bord latéral droit de l'artère mésentérique supérieure.

Les ganglions lymphatiques régionaux pour les tumeurs du corps et de la queue du pancréas sont ceux le long de l'artère hépatique commune, de l'axe cœliaque, de l'artère splénique, du hile splénique, rétro-péritonéaux et latéro-aortiques.

Tableau 4 : M-Métastases

M0	Pas de métastase à distance
M1	Présence de métastase(s) à distance

Tableau 5 : Groupement par stade

Stade 0	Tis	N0	M0
Stade IA	T1	N0	M0
Stade IB	T2	N0	M0
Stade IIA	T3	N0	M0
Stade IIB	T1,T2,T3	N1	M0
Stade III	T4	Tous N	M0
Stade IV	Tous T	Tous N	M1

D. Dépistage, Diagnostic et traitements disponibles

1. Dépistage et diagnostic de l'adénocarcinome pancréatique

Un examen clinique est réalisé afin d'établir un bilan initial qui va permettre de déterminer la présence d'un cancer. L'état général est analysé afin de détecter des signes pouvant évoquer un cancer du pancréas. Une palpation de l'abdomen pourra mettre en évidence une extension anormale des organes.

D'autres éléments tels que les antécédents médicaux personnels, les antécédents familiaux ainsi que des douleurs abdominales ou dorsales peuvent conduire à des analyses approfondies afin de connaître la cause des symptômes. (16)

1.1. Bilan initial

Tableau 6 : Examen réalisé dans le cadre d'un bilan initial

Examen	Priorité	Objectif
Examen clinique	1 ^{er} examen obligatoire	<ul style="list-style-type: none"> • Détecter un signe éventuel de cancer du pancréas
Scanner Thoracoabdominopelvien ou Tomodensitométrie (TDM)	Systématique	<ul style="list-style-type: none"> • Affirmer la nature maligne de la tumeur • Préciser la taille de la tumeur et sa localisation • Évaluer l'extension de la tumeur • Évaluer si la tumeur est résécable
Écho-endoscopie associée à une biopsie	Non systématique	<ul style="list-style-type: none"> • Déterminer les liaisons entre la tumeur et les vaisseaux sanguins • Évaluer la possibilité d'effectuer une intervention chirurgicale
Examen anatomopathologique	Systématique après une biopsie ou une exérèse	<ul style="list-style-type: none"> • Étudier les caractéristiques des cellules de la tumeur
Échographie abdominale	Non systématique	<ul style="list-style-type: none"> • Prescrite lorsque la réalisation d'un scanner est impossible

Bilan biologique	Systématique	<ul style="list-style-type: none"> • Analyser l'état général du patient • Doser l'antigène CA 19-9 permettant de donner une indication sur la présence d'un cancer
IRM pancréatique	Non systématique	<ul style="list-style-type: none"> • Préciser la taille et la localisation de la tumeur dans le pancréas • Complément au diagnostic par scanner • Détecter les métastases hépatiques
Biopsie	Systématique	<ul style="list-style-type: none"> • Déterminer le caractère cancéreux des tissus • Réaliser un examen anatomopathologique sur les tissus anormaux

Toutes les modalités d'imagerie décrites ci-dessus permettent de classer la tumeur en fonction de sa résecabilité. Des modèles types ont été mis en place afin de faciliter l'interprétation des clichés pour les radiologistes. La mise en place d'un protocole de tomodensitométrie (TDM) pancréatique multiphasique en coupes minces est l'examen de préférence pour obtenir des images de grande qualité. Ces clichés permettront de classer la maladie non métastatique au plan anatomique en trois groupes : cancer du pancréas résecable, à la limite de la résecabilité ou localement avancé non résecable. Cette classification prend également en compte l'envahissement du réseau vasculaire veineux ou artériel (17).

1.2. Bilan d'extension

Le bilan d'extension permet d'évaluer l'étendue des lésions du cancer du pancréas ainsi que les lésions des organes environnants si elles existent.

Tableau 7 : Examens réalisés dans le cadre d'un bilan d'extension

Examen	Priorité	Objectif
IRM hépatique	Systematique (avant toute pancréatectomie)	<ul style="list-style-type: none"> • Déterminer la présence de métastases dans le foie
Ponctions et biopsie des lésions hépatiques	Avant intervention chirurgicale sur les métastases	<ul style="list-style-type: none"> • Déterminer si les lésions visibles sur le foie sont des métastases • Déterminer la présence de métastases ganglionnaires lombo-aortiques
Tomographie par émission de positons (TEP-TDM ou TEP SCAN)	Non systématique	<ul style="list-style-type: none"> • Repérer des foyers de cellules cancéreuses dans l'ensemble du corps

2. Prise en charge des formes localisées (stades I à III)

La prise en charge thérapeutique est orientée par les caractéristiques du cancer, c'est-à-dire en fonction du stade du cancer et de son étendue. En fonction du diagnostic, il pourra être déterminé si une intervention chirurgicale est réalisable. Si la tumeur se révèle résécable ainsi une chirurgie est possible afin d'extraire complètement la tumeur dans la mesure où l'état général et les antécédents permettent l'opération (18).

De plus afin qu'une tumeur soit résécable celle-ci doit être limitée au pancréas, elle ne doit pas avoir envahi les vaisseaux sanguins importants dont l'artère mésentérique supérieure, l'artère hépatique ou le tronc coéliquaie.

2.1. Tumeur résécable

La chirurgie est le traitement de référence lorsque la tumeur est résécable. Selon la localisation de la tumeur, différents types d'interventions sont possibles :

- Une duodéno pancréatectomie céphalique est réalisée dans le cas d'un cancer de la tête du pancréas ;
- Une spléno pancréatectomie gauche dans le cas d'un cancer du corps ou de la queue du pancréas ;
- La pancréatectomie totale est rarement réalisée.

Cet acte chirurgical est suivi d'une chimiothérapie adjuvante. Le traitement débute 12 semaines après la chirurgie pour une durée de 6 mois. Le but de ce traitement est de détruire les cellules cancéreuses persistantes après l'intervention chirurgicale. La prise en charge thérapeutique a évolué dans le temps , plusieurs agents cytotoxiques sont utilisés : on parle de polychimiothérapie (19).

Cependant, la principale problématique post-opératoire reste le dépistage et le traitement efficace des complications pouvant survenir après la chirurgie. En effet il faut être vigilant en ce qui concerne les fistules pancréatiques et ses conséquences, telle que l'hémorragie par érosion vasculaire, le sepsis, la gastroparésie et la dénutrition. Ses complications ont une valeur négative sur le pronostic de la maladie (20).

Environ 1/4 des patients ayant subi une résection de la tumeur ne reçoivent pas de chimiothérapie adjuvante par la suite (21) (22). Pour les ¾ des patients restants pour lesquels il apparait une récurrence au niveau de la graisse péri-pancréatique où la paroi duodénale a été envahie, une chimiothérapie adjuvante est prescrite. La proportion importante de récurrence est en faveur à un complément par chimiothérapie adjuvante (23).

Ce schéma thérapeutique est suggéré par différents essais cliniques dont l'essai français PANACHE de phase III comparant une chirurgie d'emblée à une chimiothérapie néo adjuvante par FOLFOX ou par FOLFIRINOX.

FOLFOX est une association de chimiothérapie composée d'acide folique, de fluorouracile et d'oxaliplatine. L'acide folique est présent afin d'améliorer l'activité du fluorouracile (24). FOLFIRINOX est une association de fluorouracile à 400mg/m² en bolus et 2400 mg/m² en infusion continue sur 24 heures, d'oxaliplatine à 85 mg/m², d'irinotecan à 180 mg/m² ; de l'acide folique à 400 mg/m² (17).

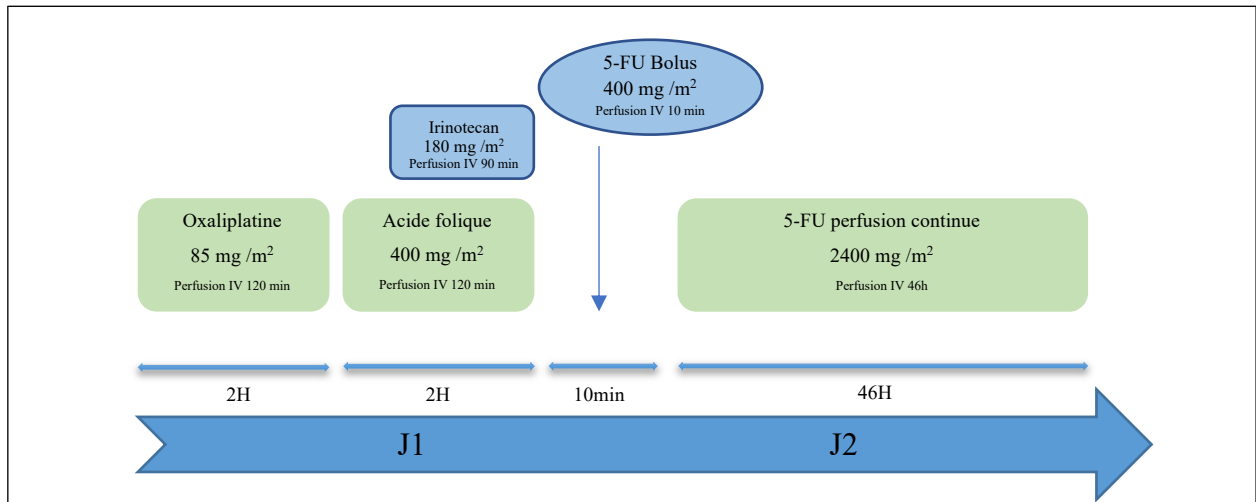


Figure 11 : Étapes du protocole FOLFIRINOX

Le schéma thérapeutique FOLFIRINOX est le suivant : (Figure 11)

L'oxaliplatine est administré à la dose de 85 mg/m² par voie IV durant deux heures environ. Dès la fin de la perfusion d'oxaliplatine, le traitement se poursuit par l'administration d'acide folinique à la dose de 400 mg/m². Trente minutes après le début d'infusion de l'acide folinique, l'irinotecan est administré par voie IV à la dose de 180 mg/m² pour une durée de 1h30. Enfin, dès l'arrêt de ces deux produits, un bolus de 5-FU (400 mg/m²) est administré pendant 10min environ puis le 5-FU en perfusion continue (2400 mg/m²) est mis en place pour une durée de 46 heures.

L'association FOLFIRINOX est aujourd'hui un standard thérapeutique dans le traitement de l'adénocarcinome du pancréas métastatique.

2.2. Tumeur borderline ou localement avancée

Une tumeur borderline est une tumeur à résécabilité limitée. Une tumeur localement avancée correspond quant à elle à une tumeur non résécable en l'état.

Une chimiothérapie d'induction dite néo-adjuvante peut être proposée dans le cas d'une tumeur borderline. La chimiothérapie d'induction ayant la meilleure évaluation est l'association FOLFIRINOX. Cette association est proposée dans le traitement des tumeurs borderline avant l'intervention chirurgicale. Elle permet d'obtenir après 6 à 8 cures des taux de résécabilité d'environ 60-65 % (25,26). Les patients pour lesquels cette association est contre-indiquée, n'ont pas de traitement substitutif.

Une radiothérapie associée à la chimiothérapie peut également être mise en place. Une radiochimiothérapie de 50 ou 54 Grays associée à la prise de Capécitabine pourrait améliorer le taux de résection de la tumeur (25).

Pour évaluer la résécabilité secondaire d'une tumeur borderline préalablement traitée par chimiothérapie avec ou sans radio-chimiothérapie, il est recommandé de réaliser une TDM thoraco-abdomino-pelvienne et une IRM hépatique avec séquences.

L'appréciation de la résécabilité secondaire doit reposer sur plusieurs arguments cliniques (disparition des douleurs), biologiques (diminution du CA 19-9 sérique, évaluée en tenant compte de la correction de l'ictère et d'un éventuel diabète) et radiologiques.

2.3. Tumeur localement avancée

Une tumeur localement avancée est non résécable d'emblée ou non résécable malgré la mise en place d'une chimiothérapie d'induction. Dans ce cas une chimiothérapie est réalisée pendant 3 à 6 mois puis en association avec une radiothérapie dans certains cas.

L'association FOLFIRINOX, complétée par une radio chimiothérapie permet d'obtenir une résécabilité secondaire dans 20-25 % des cas (38). La résécabilité n'est appréciée que secondairement, parfois après des traitements prolongés.

Comme le cas des tumeurs de résecabilité limite, il est difficile d'évaluer la réponse tumorale sur la seule TDM. De ce fait plusieurs paramètres doivent être pris en compte dont une bonne évolution clinique (disparition des douleurs et reprise de poids sous chimiothérapie), une baisse du CA 19-9, une réponse tumorale (ou du moins l'absence de progression), une réponse en PET-TDM au 18FDG et l'absence de métastases hépatiques en IRM.

3. Formes métastatiques (stade IV)

Dans le cas d'un cancer présentant des métastases, il est recommandé de mettre en place une chimiothérapie conventionnelle lorsqu'il n'y a pas de contre-indication.

Les patients âgés de moins de 75 ans et présentant un très bon état général pourront être traités sous FOLFIRINOX ou gemcitabine-nabpaclitaxel (27). Le schéma thérapeutique suivant sera mis en place : Gemcitabine 1 000 mg/m² en perfusion de 30min puis Nab-paclitaxel 125mg/m² à J1, J8, J15 avec une reprise du cycle à J29. Pour les patients ayant un état général plus dégradé ou ayant plus de 75 ans, le traitement recommandé est la gemcitabine (1 000 mg/m² en perfusion de 30 min à J1, J8, J15, J22, J29, J36, J43 avec reprise du cycle à J57) ou l'association gemcitabine +/- nabpaclitaxel (26, 27).

Pour les patients présentant une cholestase (bilirubine totale > 1,5 fois la valeur normale sachant que les valeurs normales sont comprises entre 3 et 10 mg/L) aucun traitement par chimiothérapie ne peut être conseillé. Seule un drainage biliaire peut être recommandé.

Lorsque les patients sont dans un état général très mauvais, seule une prise en charge palliative est possible. Il est rare que les métastases soient retirées par chirurgie car pour cela il faut premièrement traiter efficacement la maladie. Tout au long de la prise en charge, l'objectif sera de soulager les symptômes et maintenir une qualité de vie correcte.

4. Besoin médical

Malgré l'ensemble des traitements disponibles, les récurrences du cancer du pancréas sont très fréquentes après un traitement chirurgical. Les traitements médicamenteux quant à eux présentent de nombreux effets indésirables et nécessitent un programme de suivi assez lourd. Il se trouve que la présence d'un taux élevé du marqueur CA 19-9 est associé à un plus grand risque de récurrence. De ce fait, il est important de doser ce marqueur à la suite d'une intervention chirurgicale. Cependant, les chances de rémission restent très limitées même lorsque les récurrences sont diagnostiquées tôt. Il est donc nécessaire de développer une nouvelle approche thérapeutique plus efficace (29).

2. Stratégie de développement des CAR-T cells

A. Développement des CAR-T Cells

1. Développement pré-clinique

Les CAR-T cells sont des lymphocytes T génétiquement modifiés afin de reconnaître un antigène spécifique. Ces cibles sont complexes, spécifiques et exclusives à l'être humain, c'est pourquoi leur toxicité ne peut pas être étudiée in vivo chez des modèles animaux. Les études de toxicité chez des souris transgéniques ne sont pas représentatives de ce qui se passe chez l'Homme à cause des multiples différences entre les protéomes des deux espèces.

Aujourd'hui, il n'existe pas de modèle dont l'étude serait pertinente pour les études de toxicité des CAR-T cells (30,31). C'est la raison pour laquelle lors de l'élaboration de la substance active, des tests de cross-réactivité doivent mettre explicitement en évidence la spécificité des LT transduits pour leurs cibles. Cette spécificité sera vérifiée lors de la fabrication du produit par des contrôles de lots libératoires afin de garantir la sécurité du patient.

Ainsi, les médicaments appartenant à cette classe thérapeutique, ne peuvent pas faire l'objet d'études de toxicité à dose unique / dose multiple ; de génotoxicité ; de reprotoxicité ; de toxicocinétique et de tolérance locale.

2. Cadre réglementaire des essais pré-cliniques :

Le cadre réglementaire permet d'assurer le bon déroulement de la phase préclinique.

Au niveau de l'International Conference Harmonization (ICH), certaines guidelines encadrent les essais pré-cliniques réalisables.

Le cadre réglementaire des essais pré-cliniques est détaillé dans les guidelines suivantes :

- ICH M3 : Guidance on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals (32).
- ICH S7A: Safety pharmacology studies for human pharmaceuticals (33).
- ICH S6: Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals (34).

L'ICH S6 résume les objectifs du développement préclinique des thérapies innovantes qui s'appliquent aux CAR-T cells.

En dehors de l'ICH, d'autres réglementations encadrent la qualité et les modalités de déroulement des essais précliniques en fonction des régions où ils sont réalisés.

Les directives et recommandations scientifiques sont mises en place par l'EMA, l'ICH, la FDA et l'OCDE. Les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) permettent d'encadrer tout le processus qualité de développement non-clinique du médicament expérimental (35). Les Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL) encadrent tous les aspects organisationnels et opérationnels pour les essais de sécurité non-clinique. Elles permettent de garantir la reproductibilité, la qualité et l'intégrité des données (in-vivo et in-vitro) (36).

3. Cadre réglementaire des essais cliniques

Le règlement européen (CE) n°1394 /2007, publié en 2007, définit une nouvelle classe de médicaments biologiques, les médicaments de thérapie innovante (MTI) ou Advanced Therapy Medicinal Products (ATMP). Cette classe de médicaments regroupe 4 catégories différentes dont : les médicaments de thérapie cellulaire somatique, les médicaments issus de l'ingénierie cellulaire, de l'ingénierie tissulaire et de la thérapie génique, éventuellement couplés à des dispositifs médicaux. Les CAR-T cells sont quant à eux classés comme médicaments de thérapie génique. Cela a donné lieu à la création du CAT (Comité des thérapies innovantes), il s'agit d'un nouveau comité européen en charge de l'évaluation de cette nouvelle classe de médicaments complexes apportant des progrès majeurs (37).

La réglementation des essais cliniques est très encadrée et très stricte. Toutes les étapes des essais cliniques sont régies par des guidelines et des textes éthiques fondamentaux. Nous allons évoquer les principales guidelines à considérer lors des essais cliniques.

Les bonnes pratiques cliniques étant une norme internationale de qualité éthique et scientifique pour la conception, la conduite, l'enregistrement et la déclaration des essais impliquant la participation de sujets humains.

Ainsi l'ICH E6, vise à fournir une norme unifiée aux régions de l'ICH afin de faciliter l'acceptation mutuelle des données cliniques par les autorités réglementaires de ces juridictions (38). Il est également important de tenir compte de la guideline sur les stratégies d'identification et d'atténuation des risques pour les premiers essais cliniques sur l'homme et les essais cliniques précoces avec des médicaments expérimentaux. Quant à l'ICH E8, ce dernier définit les considérations générales relatives aux études cliniques décrivant les principes et pratiques acceptés à l'échelle internationale dans la conception et la conduite des études cliniques (39).

L'expérimentation humaine est encadrée depuis les années 40 par un code définissant la première réglementation des essais cliniques de l'histoire. Le Code de Nuremberg (26), datant de 1947 prescrit le respect des règles suivantes lors d'expérimentations humaines (en 10 points, abrégés ici) :

- 1) Il est absolument essentiel d'obtenir le consentement volontaire du malade.
- 2) L'essai entrepris doit être susceptible de fournir des résultats importants pour le bien de la société qu'aucune autre méthode ne pourrait donner.
- 3) L'essai doit être entrepris à la lumière de l'expérimentation animale et des connaissances les plus récentes de la maladie étudiée.
- 4) L'essai doit être conçu pour éviter toute contrainte physique ou morale.
- 5) Aucun essai ne devra être entrepris s'il comporte un risque de mort ou d'infirmité, sauf peut-être si les médecins eux-mêmes participent à l'essai.
- 6) Le niveau de risque pris ne devra jamais excéder celui qui correspond à l'importance humanitaire du problème posé.
- 7) Tout devra être mis en œuvre pour éviter tout effet secondaire à long terme après la fin de l'essai.

- 8) L'essai devra être dirigé par des personnalités compétentes. Le plus haut niveau de soins et de compétences sera exigé pour toutes les phases de l'essai.
- 9) Pendant toute la durée de l'essai, le malade volontaire aura la liberté de décider d'arrêter si celui-ci procure une gêne mentale ou physique et si de quelque autre façon, la continuation de l'essai lui paraît impossible.
- 10) L'expérimentateur doit se préparer à arrêter l'essai à tout moment, s'il a des raisons de croire en toute bonne foi et après avoir pris les avis les plus compétents, que la continuation de l'essai risque d'entraîner la mort ou l'infirmité des malades.

Des recommandations concrètes ne seront proposées qu'à partir de 1964 avec la Déclaration d'Helsinki (40). C'est une déclaration de principes éthiques dont l'objectif est de fournir des recommandations aux médecins et autres participants à la recherche médicale sur des êtres humains. Celle-ci comprend également les études réalisées sur des données à caractère personnel ou des échantillons biologiques non anonymes.

B. Autorisations préalables

1. Demande d'essai clinique : CTA – EMA

Le règlement n°536/2014 du parlement Européen et du conseil du 16 avril 2014 concernant les essais cliniques de médicaments à usage humain et abrogeant la directive 2001/20/CE explicite la demande d'essai clinique. (41) Cela implique la demande d'essai clinique à tous les États membres concernés à travers un portail de soumission unique le CTIS (Clinical Trial Information System). Les essais cliniques devront avoir lieu dans un des États membres de l'UE parmi les 27 membres de l'Union européenne (UE). L'Islande, le Lichtenstein et la Norvège font également partie des États concernés par la soumission unique en tant que pays signataires du traité de l'Espace économique européen (EEE). Le dossier de demande d'autorisation doit être harmonisé pour permettre une compréhension par tous les États membres (mêmes informations).

L'essai clinique doit appliquer les exigences suivantes :

- le respect des exigences en matière de consentement éclairé énoncées au chapitre V ;
- la conformité des dispositions relatives à la récompense ou à l'indemnisation des sujets avec les exigences énoncées au chapitre V et aux enquêteurs ;
- le respect des dispositions relatives au recrutement des sujets aux exigences énoncées au chapitre V ;
- le respect de la directive 95/46/CE ;
- le respect de l'article 49 ;
- le respect de l'article 50 ;
- le respect de l'article 76 ;
- le respect des règles applicables au prélèvement, au stockage et à l'utilisation future d'échantillons biologiques du sujet.

Depuis le 31 janvier 2023, les demandes d'essais cliniques ont pour obligation d'être soumises à travers le portail unique européen. L'utilisation du portail national n'est plus permise. La prochaine étape sera de mettre en conformité les précédents essais cliniques approuvés sous directive 2001/20/CE et de les enregistrer sous CTIS.

Dans le cas des CAR-T cells, le règlement sur les médicaments de thérapie innovante s'applique dans l'UE, au sein du Center for Biologics Evaluation and Research (CBER) Office of Cellular.

Cependant certains CAR-T sont considérés comme des organismes génétiquement modifiés (OGM) par certains États membres de l'UE. Ainsi avant toute évaluation clinique un certificat de libération spécifique aux OGM doit être délivré par les états concernés (42).

2. Demande d'essai clinique : IND – FDA

Les thérapies à base de cellules T génétiquement modifiées sont réglementées par le règlement sur les médicaments de thérapie innovante au sein du centre des thérapies tissulaires et géniques de la FDA aux États-Unis (43).

A partir de la phase 1, l'Investigational New Drug ou IND doit être soumis aux autorités, pour avoir l'autorisation de tester un nouveau médicament chez l'Homme.

Un IND contient diverses informations dont (44) :

- Informations CMC (Chimie – Fabrication – Contrôles) pouvant assurer la qualité du produit.
- Informations sur les lots.
- Données sur le protocole clinique.

Pre-IND meeting - Food Drug and Administration :

Cette réunion permet de poser des questions à la FDA sur le développement d'un médicament. Cela a pour but de réduire le délai de mise sur le marché en définissant clairement les paramètres et les objectifs du développement en obtenant le soutien de la FDA pour une stratégie proposée. De plus, la FDA apporte son soutien afin d'identifier et éviter les études qui pourraient s'avérer inutiles au développement clinique. Un avis sur la stratégie d'enregistrement peut également être communiqué à l'autorité de santé afin d'avoir un avis éclairé permettant d'optimiser le lancement du médicament sur le marché.

C. Fabrication

1. Généralités

Afin d'identifier et de produire des séquences de TCR spécifiques de cellules tumorales, il y a plusieurs étapes (45). Dans un premier temps l'identification des lymphocytes T réactifs à un épitope particulier peut se faire de trois façons différentes :

- À la suite de la recherche et de la mise en évidence de cellules infiltrant la tumeur chez des patients infectés.
- Par immunisation d'une souris transgénique exprimant le CMH humain d'intérêt avec l'antigène d'intérêt associé à la tumeur.
- Par production in vitro de cellules T réactives à partir de cellules T de donneurs sains.

Le génome des TCR d'intérêts identifiés est ensuite séquencé afin de déterminer le transcriptome complet de la cellule et la séquence d'intérêt à transmettre aux cellules naïves pour qu'elles puissent exprimer ce TCR d'intérêt à leur surface.

Pour intégrer les gènes d'intérêt dans les cellules naïves, on utilise un vecteur viral de type lentivirus non pathologique, non cytotoxique et non répliquatif, qui a la propriété de transférer de l'acide nucléique dans le génome de la cellule. L'utilisation d'un rétrovirus est possible mais n'est cependant pas recommandé car comme la plupart des vecteurs rétroviraux ciblent les unités transcriptionnelles, il y a un risque théorique accru d'insertion dans une unité transcriptionnelle impliquée dans la division cellulaire lors de la transduction. Ce phénomène peut être à l'origine de mutations d'oncogènes par mutagenèse insertionnelle.

Ce vecteur viral sera produit in vitro par association du squelette du lentivirus d'intérêt, de 3 plasmides codant respectivement pour l'enveloppe, la reverse transcriptase et la polymérase et de la portion d'acide nucléique, appelé le transgène.

Le transgène est lui-même composé de plusieurs régions : deux parties variables des chaînes α et β identifiées à partir du transcriptome des lymphocytes infiltrant la tumeur (α_V et β_V) ; une partie FURin-P2A ainsi que deux parties constantes des chaînes α et β issues d'un modèle murin (α_{-mc} et β_{-mc}).

Ce complexe chimérique immunoglobuline/TCR permet d'obtenir un récepteur fonctionnel et spécifique pour un antigène et s'incorporera naturellement entre les deux LTR du vecteur viral.

Pour assembler le vecteur viral, une lignée cellulaire amplifiée est utilisée pour sa production. Les cellules HEK 293T sont des cellules de référence pour la production de vecteurs. L'assemblage et l'expression de tous les plasmides cités ci-dessus donnera une protéine virale. La récolte du surnageant du milieu de culture permet la récupération de cette protéine virale et la mesure de la quantité de particule infectieuse efficace produite.

Une fois le vecteur viral produit, ce dernier est mis en culture avec des cellules T du patient. Cela va permettre de transduire leur acide nucléique contenant la séquence TCR d'intérêt dans le génome de la cellule pour permettre la reconnaissance des cellules tumorales. Ces cellules T sont ensuite testées in vitro pour la caractérisation de leur affinité avec leur ligand, leur spécificité et leur efficacité.

Les CAR-T cells obtenues sont des lymphocytes T modifiés exprimant une variable de fragment de la chaîne unique (scfv), qui va reconnaître un antigène associé à une tumeur indépendamment du CMH, il sera alors possible d'obtenir à la fois des lymphocytes TCD4+ et TCD8+ dirigés contre cet antigène (Figure 12) (46).

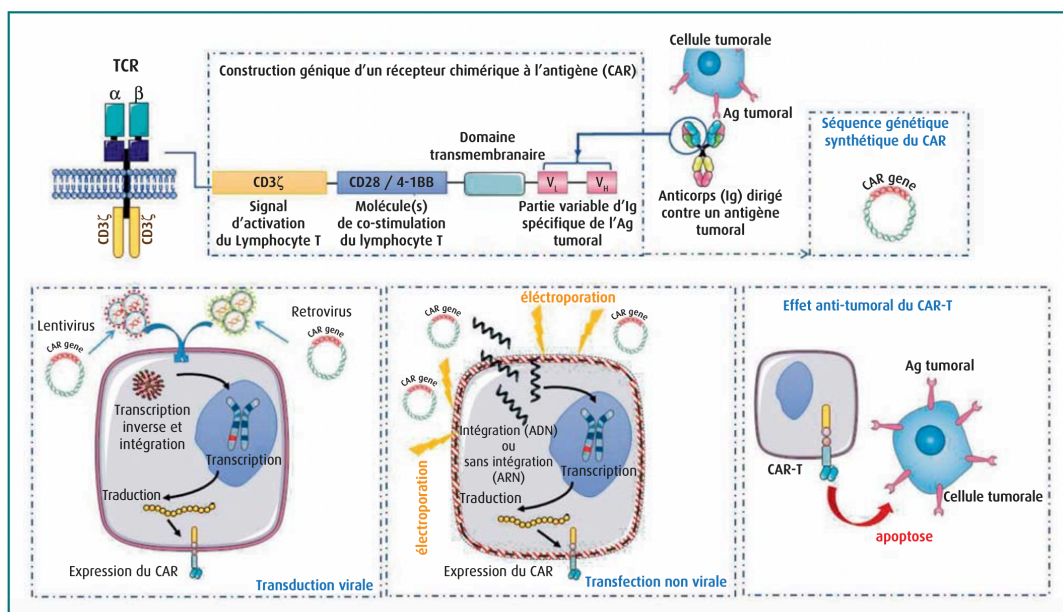


Figure 12 : Production des CAR-T cells

2. Cellules T transduites

Le processus de transformation des cellules T en cellules effectrices se fait ex vivo. Une leucaphérèse est réalisée sur le patient afin de collecter ses cellules mononuclées (Figure 13). Les lymphocytes sont ensuite isolés et mis en culture avec le vecteur viral afin d'exprimer le transgène codant pour notre CAR-T spécifique à la protéine. Le produit final est récolté et formulé à une dose spécifiée. Enfin, des tests de qualité et de libération sont effectués sur chaque lot pour garantir la sécurité du produit final.

La plupart des schémas posologiques de cellules CAR-T nécessitent une étape d'expansion post-modification pour obtenir un nombre cliniquement significatif de cellules pour le traitement. Il est donc essentiel de disposer de méthodes conformes aux Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) pour développer ces cellules avant la récolte du produit.

Remarque : Les facteurs importants à prendre en compte lors de l'expansion des cellules CAR-T ex vivo comprennent (47) :

- La fourniture de milieux riches en nutriments adéquats.
- L'optimisation des échanges gazeux.
- Le fonctionnement dans un système fermé dans la mesure du possible.

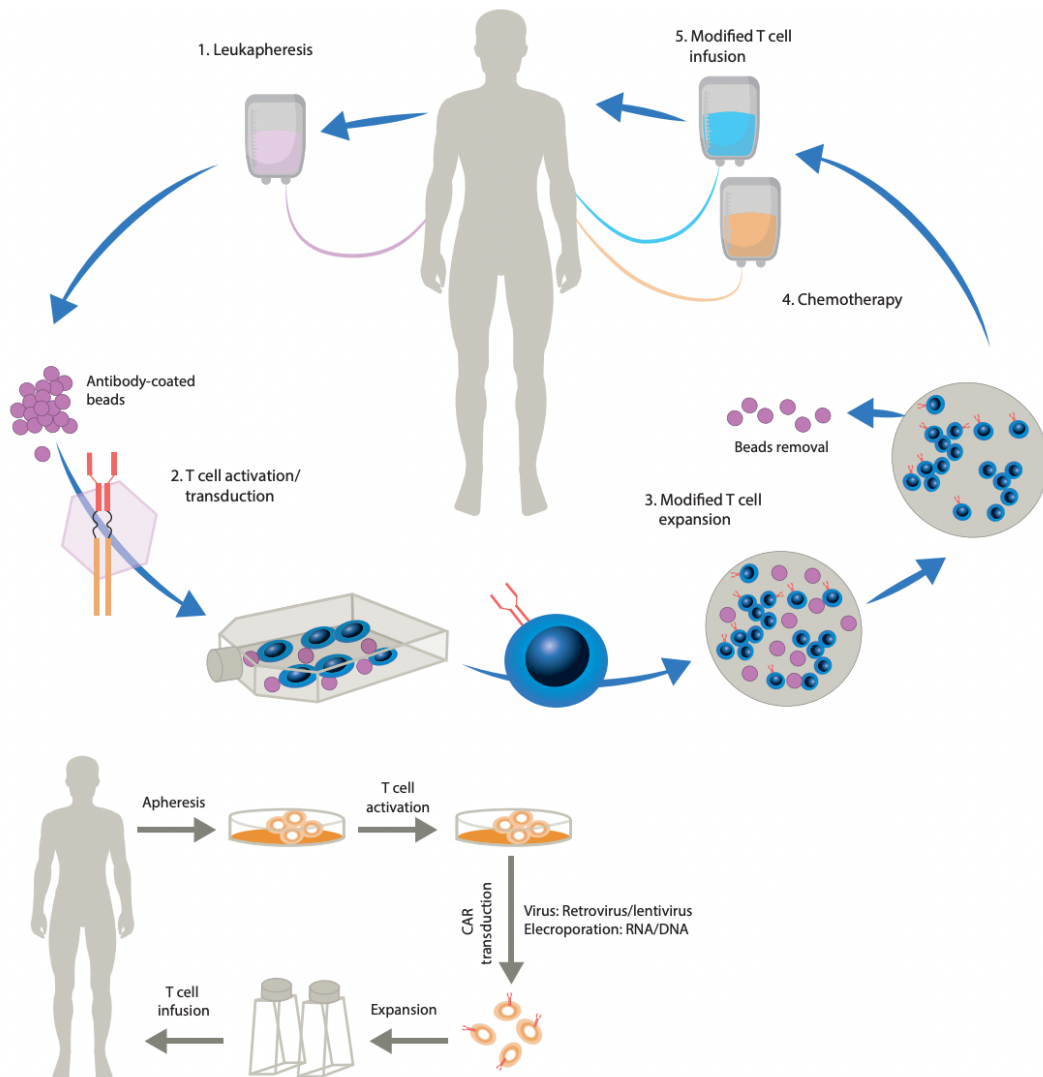


Figure 13 : Étapes de fabrication des CAR-T cells

3. Production et distribution

Le lieu du site de production est un élément clé de qualité et de gain de temps dans le circuit de prise en charge du patient, sa proximité avec les hôpitaux peut permettre de gagner quelques jours de transport. La production des CAR-T cells doit répondre à des critères spécifiques et précis en termes d'équipements matériels, de personnels, de procédés de fabrication, de contrôle de produit fini et de certification conformément aux Bonnes Pratiques de Fabrication.

3.1. Étape d'acheminement du produit

L'acheminement se fait en 8 étapes :

- La commande par un centre hospitalier auprès du laboratoire pharmaceutique.
 - La leucaphérèse du patient.
 - La vérification et la congélation des cellules par des techniciens agréés du laboratoire d'analyse médical hospitalier.
 - L'expédition au centre de production des cellules CAR-T le plus proche.
 - La modification génétique des lymphocytes T d'intérêt.
 - La mise en culture pour multiplication des cellules transduites jusqu'à l'obtention de la dose recommandée.
 - La vérification de la qualité de la poche par le responsable qualité du site de production.
- L'expédition à la pharmacie du centre hospitalier qualifié.

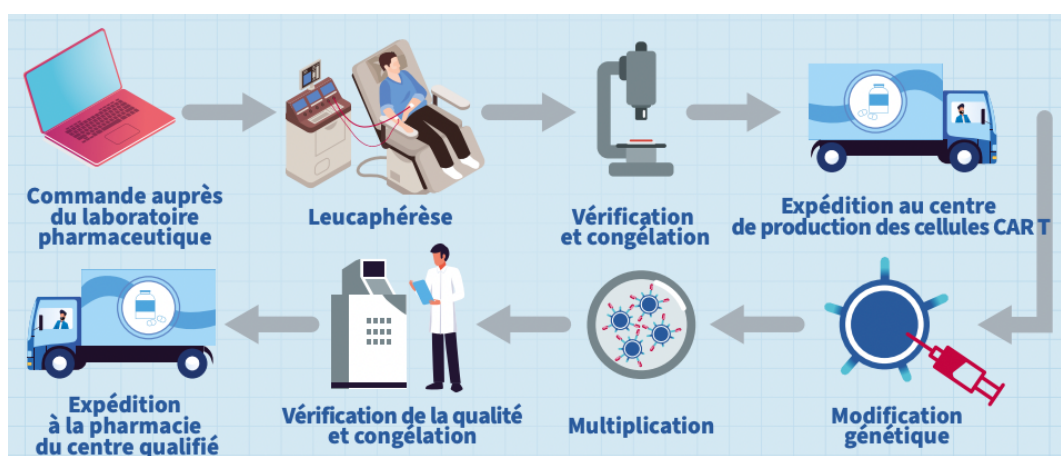


Figure 14: Étapes d'acheminement des CAR-T Cells (48)

3.2. Stockage

Les CAR-T cells sont stockés à des températures inférieures à -150 °C dans de l'azote. Ce stockage peut être prolongé mais il doit respecter certaines réglementations en conservant le produit dans une cuve d'azote dédiée aux médicaments de thérapies innovantes (MTI), qui doit être située dans un local sécurisé et ventilé (49).

L'ensemble du personnel étant amené à manipuler le produit contenu dans l'azote devra utiliser un équipement de protection individuelle (EPI) dont des visières, des gants et des habits couvrants le corps pour éviter toute brûlure dans le cas d'une projection. Le logo « biohazard » devra être visible sur les locaux de stockage, de transport et de préparation afin d'avertir concernant le risque biologique. Tous les transferts de poches doivent être réalisés dans des récipients adaptés qui assurent la protection contre les chocs. L'étanchéité ainsi qu'une température de type « dry-shipper » c'est-à-dire un transport dans des conteneurs en azote à sec doivent être minutieusement contrôlés. Les températures de stockage dans la chambre d'expédition restent à environ -190° C.

Le conditionnement des poches décongelées doit pouvoir assurer l'étanchéité et la prévention des chocs jusqu'au site d'administration (50).

3.3. Packaging & labelling

La poche contenant les lymphocytes T du patient possède un identifiant numérique unique afin d'assurer la traçabilité et un suivi sécurisé tout au long du parcours de soin. L'identité du patient doit être vérifiée avant et après la leucaphérèse, ce après quoi une étiquette traduite en anglais et en langue locale du centre hospitalier destinataire sera apposée sur la poche.

Un QR code présent sur cette étiquette doit ensuite être scanné à chaque étape du processus de production, il contiendra les informations sur le malade, les dates clés des procédés de production et les opérateurs liés.

Une fois la transduction effectuée, les cellules génétiquement modifiées seront comptées par la méthode de cytométrie en flux et conservées dans une seconde poche avec une étiquette également traduite en anglais et dans la langue locale du centre hospitalier destinataire et comprenant le même QR code de traçabilité.

D. Principaux défis de la technologie des CAR-T

1. Contexte (45)

De nombreux défis ont été identifiés dans la fabrication et la commercialisation des cellules CAR-T. Il convient de relever que de tels problèmes existent à chaque étape de la fabrication dont le contrôle de la qualité, la libération du produit et la logistique. Nous allons principalement aborder les défis liés à l'obtention et à la croissance des cellules T dans la conception de CAR-T cells. En effet il s'avère que la fabrication de cellules CAR-T présente de nombreuses problématiques, car les produits cellulaires autologues obtenus à partir de patients gravement malades fournissent un matériel cellulaire de départ très hétérogène. A cette spécificité, s'ajoute un environnement réglementaire très complexe. De plus, lorsque l'on considère les cibles potentielles des cellules CAR-T, il faut choisir une molécule qui permet une clairance tumorale maximale tout en limitant les effets hors tumeur. De tels marqueurs de surface tumorale spécifiques, mais conservés, sont limités.

2. Les défis cliniques

2.1. Surmonter les défis de fabrication des cellules CAR-T

Les BPF exigent que les produits finaux répondent systématiquement aux spécifications prédéfinies, mais dans le cadre de la thérapie cellulaire CAR-T autologue, le matériel source (sang total ou matériel de leucaphérèse) est hétérogène. Le nombre de cellules prélevées chez les patients est variable en raison de facteurs tels que l'avancée de la maladie ainsi que les traitements administrés antérieurement. De ce fait il est important de mettre en place un protocole permettant d'optimiser la collecte, la purification et l'activation des produits de cellules T.

La logistique fait également partie des défis majeurs. Un suivi spécifique au patient du matériel doit être mis en place au sein du centre de fabrication. Sachant qu'il s'agit d'une médecine personnalisée, il est primordial d'avoir un suivi très étroit. Ces efforts de qualité doivent être accompagnés par une meilleure rentabilité du produit tout en réduisant les coûts en effectuant des tests sans failles.

La transduction vectorielle des CAR-T cells implique l'activation des cellules pour entrer dans le cycle cellulaire, puis l'expansion des cellules après transduction in vitro. Cependant, ce processus peut modifier le phénotype des cellules diminuant leur qualité ainsi que le rendement des cellules produites. Afin d'améliorer cette étape de production, il sera possible à l'avenir, de transduire des lymphocytes T avec une induction minimale du cycle cellulaire en utilisant des cytokines telles que l'interleukine (IL)-7 pour réduire les modifications relatives du phénotype cellulaire. Grâce à cette alternative, la mémoire de longue durée des cellules souches, la mémoire naïve, la mémoire centrale et la mémoire effectrice des sous-ensembles de lymphocytes T seront transduites dans leur état natif. Il existe malgré tout un paramètre non modifiable sur lequel nous ne pouvons pas agir. Il s'agit de l'expansion des CAR-T cells au sein de l'organisme du patient qui peut être très variable d'un patient à l'autre.

D'après de nombreux essais cliniques, il est plus avantageux d'utiliser des vecteurs lentiviraux qui peuvent transduire des cellules non en division. Ces vecteurs transduisent potentiellement des cellules T à mémoire de cellules souches qui ne sont pas en division, naïves, à mémoire centrale et à mémoire effectrice dans leur état natif ainsi que des cellules en division activées par CD3/CD28. Les différences entre les motifs de signalisation des CAR-T cells affectent également la persistance dans la culture cellulaire ainsi que le développement de la mémoire dans la population de cellules CAR-T lorsqu'elles sont réinjectées au patient (51).

En outre, la fréquence des sous-ensembles de mémoire des lymphocytes T change avec le temps (52). À leur tour, ces sous-ensembles varient considérablement dans les produits d'aphérèse collectés, ce qui remet en question la normalisation de la fabrication.

Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour définir le phénotype optimal des cellules T pour la fabrication de cellules CAR-T.

2.2. Réplicabilité de la production des CAR-T

La principale difficulté dans la production des CAR-T est de fournir une thérapie personnalisée à grande échelle. L'objectif sera de permettre la collecte d'une quantité suffisante de lymphocytes T fonctionnels auprès d'individus malades. A noter que ces patients présentent un faible nombre absolu de lymphocytes et les lymphocytes existants peuvent être dysfonctionnels après des années de chimiothérapie cytotoxique. Ainsi certains patients fournissent des lymphocytes T insuffisants ou des lymphocytes T qui se développent mal ex vivo. Les stratégies de mobilisation qui favorisent la collecte des lymphocytes pourraient aider à surmonter ce défi.

De nombreuses études ont pu démontrer , que l'association d'un antagoniste du récepteur de chimiokine alpha CXCR4 (dont le plerixafor), avec un facteur de stimulation des colonies de granulocytes, entraîne un nombre plus élevé de lymphocytes T et de progéniteurs de lymphocytes T dans la collection (53,54). Cette approche peut potentiellement mobiliser les cellules CD34+ et peut affecter l'état d'activation ou le phénotype des cellules T. De plus, il est nécessaire d'utiliser les données de fabrication pour mieux prédire la réponse clinique.

La prédiction clinique reste imprévisible, car il se peut que les patients qui fournissent des cellules T se développant bien ex vivo ne répondent pas et ceux qui ont une expansion ex vivo lente et des doses cellulaires minimales peuvent subir une régression tumorale tant que l'expansion et la persistance ne se produisent pas in vivo, ce qui rend la prédiction clinique difficile.

2.3. Sélection des cibles pour maximiser l'effet et minimiser la toxicité

L'identification des antigènes cibles pour les CAR-T cells peut être laborieuse. Dans l'idéal, il faudrait que l'antigène cible c'est à dire l'antigène tumoral soit spécifique à la tumeur, donc non exprimé dans les cellules saines.

Cependant, dans de nombreux cas, les cellules normales et cancéreuses ne présentent que de fines subtilités dans l'expression de l'antigène. De plus les molécules qui sont surexprimées dans le cancer peuvent jouer un rôle dans la transformation et la migration cellulaire. L'expression de phosphopeptides spécifiques d'une tumeur ou de glycoprotéines modifiées peut être suffisante pour permettre un ciblage spécifique d'une tumeur (43).

La sélection des cibles pour maximiser l'effet apparaît particulièrement difficile pour la sélection des cibles des tumeurs solides car elles sont généralement hétérogènes et la plupart des cibles sont exprimées à un faible niveau sur les tissus bénins. Par conséquent, il est possible que des cibles spécifiques et conservées n'existent pas pour un type de tumeur donné. Si les cibles hautement exprimées sont trop prioritaires, les effets hors tumeur sur la cible sont un risque. De même, donner trop de priorité aux cibles hautement spécifiques qui ne sont exprimées que sur une minorité de cellules tumorales pose le risque de sélectionner une excroissance tumorale biaisée.

2.4. Toxicité

Comme c'est le cas de nombreuses thérapies malgré leur effet positif sur l'amélioration de la prise en charge, il y a toujours une toxicité importante. Il existe de nombreux types différents de toxicité des cellules CAR-T, y compris la toxicité « sur cible, sur la tumeur », « sur cible, hors tumeur » et « hors cible ». La neurotoxicité, l'aplasie des lymphocytes B, le syndrome de lyse tumorale (TLS) et le syndrome de libération de cytokines (CRS) sont des effets ciblés qui ont été signalés dans le traitement de patients atteints de cellules CAR-T spécifiques de CD19.

Le CRS décrit une compilation de symptômes inflammatoires résultant d'élévations des cytokines associées à l'engagement et à la prolifération des lymphocytes T. Les symptômes peuvent aller de légers et pseudo-grippaux à graves, entraînant une fuite vasculaire. Mais également une hypotension, un œdème pulmonaire et une coagulopathie, entraînant une défaillance du système multi-organes. La gestion des CRS est difficile, étant donné que la libération de cytokines est une caractéristique essentielle de l'activation des lymphocytes T et que sa suppression peut avoir un impact sur l'efficacité.

Une approche cible l'Interleukine-6 (IL-6), une cytokine importante dans le CRS, en utilisant l'antagoniste des récepteurs de l'IL-6, le tocilizumab (55).

2.5. Contrôle in vivo

Le contrôle des CAR-T cells in-vivo est un élément à envisager afin de mettre fin à l'activité in vivo des cellules CAR-T si nécessaire.

Une approche impliquant la co-expression d'un gène suicide inductible de la caspase-9 dans les cellules CAR-T a été mise en place au sein d'un essai clinique. Après ré-infusion, l'ajout d'une petite molécule peut induire l'apoptose des cellules T spécifiquement dans les cellules CAR-T (55) (56).

Alternativement, le contrôle de la fonction in vivo peut être réalisé grâce à des petites molécules bifonctionnelles. De telles molécules assurent la liaison entre l'antigène et le CAR, par exemple, un liant constitué de folate conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (folate-FITC) peut rediriger et réguler l'activité des cellules CAR-T spécifiques au FITC vers les cellules tumorales surexprimant le récepteur du folate (57) (Figure 15).

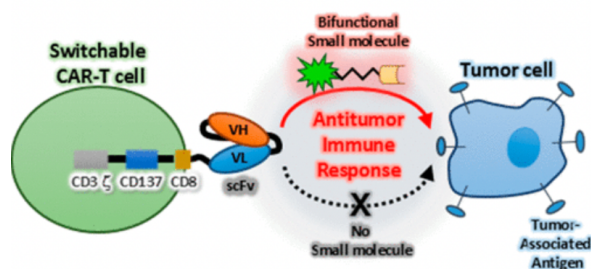


Figure 15 : Contrôle in vivo des CAR-T cells via une petite molécule bifonctionnelle

Enfin, les cellules CAR-T ont été conçues pour avoir des récepteurs divisés, dans lesquels la liaison à l'antigène et tous les composants de signalisation intracellulaires nécessaires s'assemblent uniquement en présence d'une petite molécule titrable (58).

Quel que soit le mécanisme, l'ajout d'un contrôle in vivo on-switch sur la fonction des cellules CAR-T améliore potentiellement la sécurité.

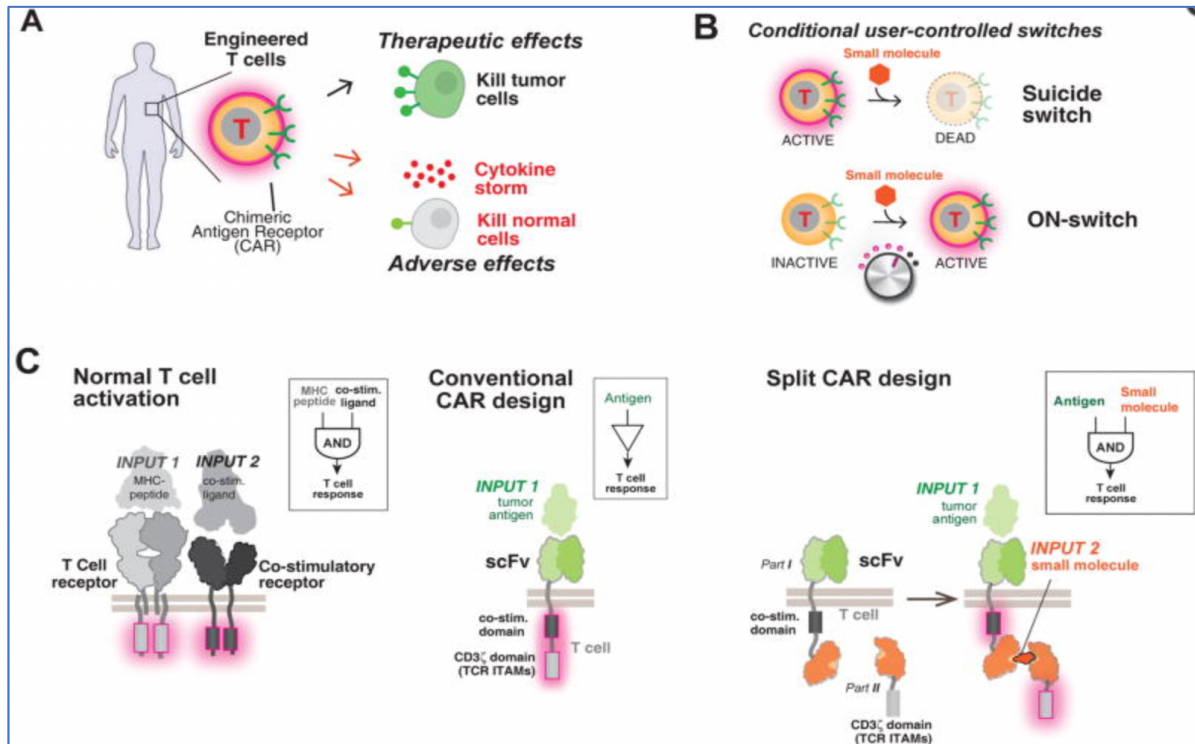


Figure 16 : Conception des CAR-T cells activés par le biais de modules de signalisation clés

(A) Les lymphocytes T modifiés exprimant des CAR peuvent avoir des effets à la fois thérapeutiques et indésirables du fait de leurs effets environnant près des cellules tumorales.

(B) Une petite molécule peut servir d'interrupteur suicide afin de déclencher l'apoptose des cellules modifiées. Cette approche complémentaire consiste à maintenir les cellules inactives jusqu'à l'ajout d'un signal de médicament activant le CAR-T grâce à une petite molécule. Un tel activateur pourrait permettre un contrôle titrable (composition vers le haut ou vers le bas) de l'activité des lymphocytes T.

(C) Stratégies moléculaires pour contrôler l'activation des lymphocytes T. La voie normale d'activation des cellules T (à gauche) implique une double activation du récepteur des cellules T (TCR) et d'un récepteur co-stimulateur pour déclencher des réponses cellulaires clés telles que la production et la prolifération de cytokines.

Le CAR conventionnel (au milieu) combine un domaine de reconnaissance d'antigène (fragment variable à chaîne unique; scFv) avec des motifs de signalisation principaux (tels que les ITAM de la sous-unité TCR CD3zeta) et des motifs de co-stimulation liés de manière constitutive dans une seule molécule.

La stratégie envisagée est la construction d'un CAR avec interrupteur ON utilisant une construction divisée (à droite). La conception de la CAR fractionnée se présente sous forme de deux polypeptides physiquement séparés avec d'une part les motifs principaux de signalisation et d'autre part les motifs de co-stimulation qui peuvent être conditionnellement réassemblés lorsqu'un agent à petite molécule hétérodimérisante est présent.

3. Les défis réglementaires

3.1. Répartition UE et US

Le nombre d'essais cliniques concernant les cellules CAR-T en cours aux États-Unis dépasse celui présent en Europe. Il s'élève à 97 essais cliniques aux USA contre 14 au sein de l'UE (59) (Figure 17). Les raisons de cet écart ont été mis en évidence par le manque de candidats disponibles pour les essais cliniques, le financement plus important aux US et des installations de fabrications moindres en Europe (60).

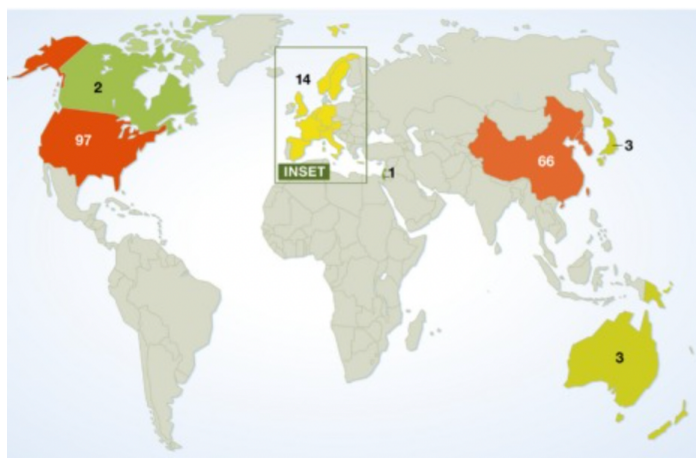


Figure 17 : Répartition des essais CAR-T dans le monde

Malgré la difficulté de comparaison de ces deux marchés très différents l'un de l'autre, il est évident qu'au niveau réglementaire de nombreux obstacles sont présents au sein de l'UE.

3.2. Réglementation au sein de l'UE

Face au manque d'infrastructure, il est nécessaire d'avoir un soutien à la création de centres cliniques regroupant à la fois la recherche et la production selon les bonnes pratiques de fabrication. Un certificat de libération avant l'évaluation clinique est obligatoire pour certains états membres de l'UE considérant les CAR-T cells comme des OGM . De ce fait, une évaluation des risques environnementaux est requise dans certains États membres. Bien que la nécessité d'une évaluation des risques pour chaque nouveau type de cellules CAR-T est perçue comme une charge inutile par les chercheurs. La mise en place d'une documentation universelle sur la caractéristique OGM des CAR-T cells permettrait de faciliter l'élaboration d'un dossier OGM spécifique (42).

Les États de l'UE possèdent tous différentes exigences, la directive 2001/20/CE n'a pu que partiellement harmoniser la réglementation des essais cliniques pour palier à cela, la procédure d'harmonisation volontaire (VHP) a été établie (Règlement 536 /2014 CE). En avril 2014, le Parlement européen et le Conseil ont adopté le nouveau règlement de l'UE sur les essais cliniques (règlement (UE) n° 536/2014) dans lequel un portail et une base de données électroniques de l'UE seront mis en place par l'EMA, le Conseil européen (CE) et les États membres comme point d'entrée unique pour les demandes d'essais cliniques.

Dans le cadre de cette initiative, les demandes d'essais multicentriques sont évaluées en une seule procédure avec la collaboration des autorités nationales compétentes des États membres dans lesquels l'essai se déroulera (61). Cela facilite non seulement la procédure de demande, mais oblige chaque pays à échanger et à harmoniser leur point de vue sur un produit spécifique. Néanmoins, cette harmonisation n'est pas suffisante car les connaissances diffusées à ce sujet sont moindres.

Il est primordial de mettre en place des bases de données pour les essais cliniques et les produits ATMP afin d'accélérer les demandes d'essais cliniques. Les CAR-T cells sont des produits de thérapie génique cellulaire hautement individualisés auxquels l'industrie pharmaceutique n'était pas préparée. Les exigences scientifiques et réglementaires spécifiques des MTI représentent un défi à la fois pour les chercheurs universitaires, les startups de biotechnologie, mais également pour l'industrie pharmaceutique.

Cela peut donc entraîner des retards dans les investigations cliniques. Les directives réglementaires et scientifiques sont une source précieuse pour mieux comprendre les exigences relatives à la traduction des cellules CAR-T. Cependant, il n'existe pas encore de directive concernant le domaine des cellules CAR-T, il est donc difficile de suivre l'évolution rapide de la science dans le domaine des ATMP.

Le retard pris dans les essais cliniques peut être également limité par la préparation de lignes directrices spécifiques aux cellules CAR-T lors de la soumission d'un essai clinique. Le contact avec les autorités nationales de santé compétentes doit être pris le plus tôt possible afin de consolider le dossier clinique. Pour les phases ultérieures de développement clinique en vue d'une autorisation de mise sur le marché, il est fortement recommandé de solliciter l'avis scientifique de l'EMA.

3.3. Normes de production et distribution

Au sein de l'UE, les médicaments doivent être fabriqués selon les normes de bonnes pratiques de fabrication (BPF). Cette nécessité peut être un obstacle pour la production des cellules CAR-T. La principale problématique est liée à la qualité du matériel de départ dérivé du patient qui est très variable en raison des différences entre chaque patient, à l'avancée de la maladie et aux traitements reçus.

D'autres facteurs ont également un impact sur la qualité du produit fini dont l'efficacité de la transduction, les niveaux d'expression du transgène et le nombre de copies par cellule sont des facteurs supplémentaires, qui peuvent tous avoir un impact direct sur l'efficacité et la sécurité.

Un procédé GMP garantissant un produit de qualité comparable contribuera donc au profil de sécurité des cellules CAR-T. Des lignes directrices sur les BPF spécifiques aux MTI ont été rédigées par la Commission européenne pour tenir compte des spécificités des MTI. Il est attendu que ces lignes directrices sur les BPF soient mieux délimitées par la Commission européenne afin qu'elles fournissent des orientations appropriées et harmonisées pour la fabrication spécifique aux ATMP ainsi qu'aux cellules CAR-T dans l'UE.

Les règles de bonnes pratiques de distribution (BPD) sont très importantes pour les CAR-T cells. En effet nous sommes en présence de produits autologue qui doivent être transportés du site de fabrication au site hospitalier, pouvant parfois impliquer une livraison sur un autre continent. Il est primordial d'assurer un suivi sans faille du produit et éviter tout problème pour transférer le produit personnalisé dédié au bon patient. Cependant, les hôpitaux utilisent souvent des identificateurs de produit différents de ceux du fabricant, ce qui peut entraîner une perte d'informations. À cet égard, un processus de suivi unique et harmonisé est en cours de développement par le consortium CARAT (Chimeric Antigen Receptors for Advanced Therapies) financé par HORIZON 2020 (62).

En ce qui concerne la commercialisation, quatre produits à base de cellules CAR-T de trois sociétés pharmaceutiques (KTE-C19, Kite Pharma ; CTL019, Novartis ; JCAR015 et JCAR017, Juno Therapeutics) ont obtenu l'accès au programme de médicaments prioritaires (PRIME) de l'EMA (63). Ce programme a été mis en place pour soutenir le développement de médicaments ciblant un besoin médical non satisfait, ce qui est le cas pour le traitement du cancer avec la plupart des produits CAR-T cells. Dans le cadre de PRIME, les industriels auront une interaction renforcée et un dialogue précoce avec l'EMA, afin d'optimiser les plans de développement et d'accélérer l'évaluation.

Aucun essai de phase III n'a été mené pour les produits de cellules CAR-T. En effet, une autorisation de mise sur le marché conditionnelle uniquement sur la base d'études de phase II peut être accordée lorsqu'il s'agit de produits ciblant une maladie orpheline et invalidante ou potentiellement mortelle qui démontre une efficacité convaincante avec un rapport bénéfice/risque positif.

Après approbation conditionnelle, le promoteur devra compléter la base de données existante ou fournir des données provenant de nouvelles études cliniques pour mieux définir le rapport bénéfice/risque du produit.

3. Développement en cours des CAR-T cells ciblant le cancer du pancréas

A. Contexte

L'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC) est caractérisé par un pronostic sombre et une mauvaise réponse aux traitements conventionnels. De plus le PDAC est généralement diagnostiqué à un stade tardif, avec des métastases étendues sur lesquelles les thérapies actuelles n'ont pas de résultats satisfaisants (64,65).

Actuellement, les cellules CAR-T ont montré une efficacité remarquable dans les tumeurs malignes à cellules B exprimant CD19 (66), mais une efficacité limitée dans les tumeurs solides (67). Un des obstacles à la thérapie CAR-T cells des tumeurs solides est que les antigènes tumoraux couramment ciblés sont exprimés à de faibles niveaux dans les tissus normaux, ce qui entraîne une toxicité hors tumeur ciblée. L'utilisation de cellules CAR-T contre les tumeurs exprimant HER2, CAIX et CEACAM5 a été associée à de graves toxicités dans les essais cliniques en raison de l'expression de ces antigènes dans l'épithélium des poumons et des voies biliaires (67 - 69). Des essais cliniques récents utilisant des cellules CAR-T ciblant des antigènes tels que HER2 et la mésothéline sur PDAC ont montré une efficacité limitée, avec une amélioration légère ou nulle de la survie globale (71 - 73).

L'identification d'antigènes cibles avec une expression plus restreinte dans les tissus normaux est primordiale afin d'augmenter la marge de sécurité des cellules CAR-T contre les tumeurs solides. Cela permettra une administration sûre de doses plus élevées de CAR-T cells afin d'augmenter potentiellement l'efficacité antitumorale.

B. Cible d'action

1. CEACAM7, nouvelle cible

De nombreuses études ont pu mettre en évidence une protéine cible dans le traitement de l'adénocarcinome du pancréas par les CAR-T cells. En effet, CEACAM7 est une protéine exprimée dans un grand sous-ensemble de tumeurs de l'adénocarcinome canalaire pancréatique. L'expression de cette protéine est faible à indétectable dans tous les tissus normaux testés ce qui renforce la spécificité au PDAC. L'expérimentation a également pu mettre en évidence une expression élevée dans le sous-ensemble enrichi en cellules souches cancéreuses, au sein des cultures primaires de PDAC isolées à partir de tumeurs dérivées de patients. Les cellules CAR-T ciblant CEACAM7 sont capables de cibler les cellules tumorales exprimant l'antigène et d'assurer la rémission dans les tumeurs de xénogreffe dérivées de patients (74).

2. Expression des protéines de la famille CEA

CEACAM7 est une protéine appartenant à la famille des antigènes carcinoembryonnaires (CEA), un grand groupe de protéines possédant des rôles divers, et qui sont généralement dérégulées dans les tumeurs malignes (75). La structure de cette protéine est décrite dans la figure 18. Elle possède un ancrage glycosylphosphatidylinositol (GPI) sans domaine intracellulaire et avec un domaine extracellulaire relativement petit (76).

En effet, les sphères rouges indiquent les domaines de type IgV, les sphères bleues indiquent les domaines de type IgC2, qui sont stabilisés par des liaisons disulfure (S-S). Les spirales vertes indiquent les hélices transmembranaires. Les ancres GPI sont représentées sous la forme d'une flèche verte se terminant dans la bicouche lipidique.

L'analyse de la région N-terminale de CEACAM7 suggère qu'il forme un homodimère, avec un pli similaire aux autres membres de la famille CEA, mais avec une affinité beaucoup plus élevée au sein du dimère (77). La fonction physiologique de CEACAM7 reste inconnue.

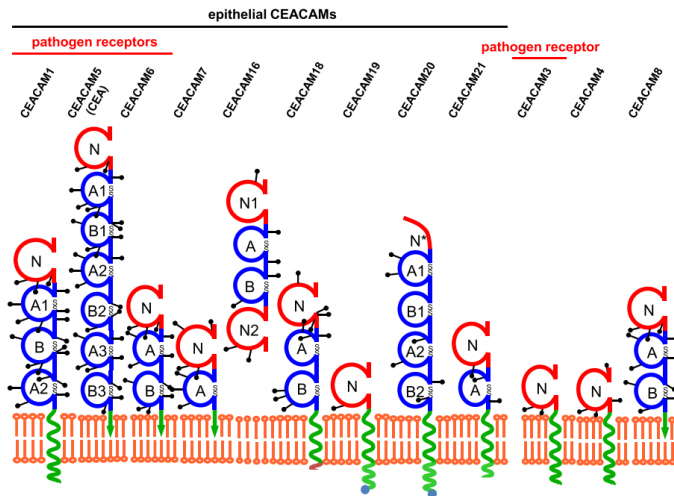


Figure 18 : Représentation schématique des douze membres de la famille des molécules d'adhésion cellulaire liées à l'antigène carcinoembryonnaire humain

Contrairement à plusieurs autres membres de la famille CEA qui sont largement exprimés, l'expression de CEACAM7 est limitée à la surface apicale des cellules canaliculaires pancréatiques et des cellules épithéliales du côlon adulte. Dans les tissus du côlon fœtal, CEACAM7 est localisé à la base des cellules épithéliales et se déplace vers la surface apicale peu après la naissance. Aucune expression de CEACAM7 n'a été démontrée dans d'autres zones du tractus gastro-intestinal telles que l'œsophage, l'estomac et l'intestin grêle, et aucune expression n'a été détectée dans des tissus tels que les poumons et le système biliaire qui ont été précédemment associés à la toxicité des cellules CAR-T (78).

L'expression de l'ARNm de CEACAM7 est cependant détectable dans les cellules épithéliales tumorales à des niveaux plus élevés que dans le pancréas normal, et a été décrite comme un marqueur diagnostique potentiel (79). CEACAM7 pourrait être une cible appropriée pour la thérapie CAR-T-cell de la PDAC pour les patients atteints de PDAC à un stade avancé.

C. Essai clinique

1. Matériel

1.1. Sang humain primaire et cellules dérivées du cancer

Les tumeurs PDAC ont été étendues sous forme de xénogreffes dérivées de patients (PDX) chez des souris immunodéprimées (80). Plusieurs cultures primaires de cellules PDAC dérivées de patients ont été utilisées dans cette étude. En outre, des cultures de cellules PDAC dérivées de cellules tumorales circulantes (CTC) c76, c102 et c139 ont été générées en interne à partir de patients atteints de PDAC de stade avancé et naïfs de chimiothérapie ont également été utilisées. Un profilage répété en tandem court de toutes les lignées cellulaires PDAC dérivées de patients a été réalisé et a confirmé le caractère unique de chacune de ces lignées. Une suspension cellulaire de 10 000 cellules/mL a été préparée et distribuée dans des flacons à surface d'attachement ultra-faible (Corning) pendant 1 semaine. Avant utilisation, les sphères ont été filtrées à l'aide d'un tamis de 40 µmol/L pour éliminer les cellules individuelles et les agrégats.

2. Méthodes

2.1. Cytométrie en flux

Les cellules cancéreuses pancréatiques dérivées de sphères et les cellules cancéreuses différenciées ont été dissociées puis diluées avec un milieu contenant du FBS (fraction de sang fœtale de vache) et lavées une fois avec du PBS (sulfure de plomb) froid. Les sphères ont été filtrées à travers des tamis cellulaires de 40 µmol/L. L'anticorps 2869 purifié isolé des surnageants d'hybridome a été utilisé pour détecter l'expression de CEACAM7, et les cellules ont été incubées pendant 1 heure à 4°C. Les cellules ont été à nouveau lavées avec du PBS froid et incubées avec un anticorps anti-souris de chèvre conjugué à Alexa Fluor 647 utilisé comme anticorps secondaire à une dilution de 1:200 pendant 30 minutes à 4 ° C dans l'obscurité. Après un lavage final avec du PBS froid, les cellules ont été remises en suspension dans du tampon FACS (1× PBS contenant 3 % de FBS, 3 mmol/L d'EDTA et 0,5 µg/mL de DAPI) et analysées par cytométrie en flux.

2.2. Essais de cytotoxicité

Les cellules cibles (cultures PDAC primaires) et les cellules effectrices (cellules T transduites avec 2869 CAR, CAR mutant ou cellules T non modifiées comme contrôle négatif) ont été étalées à des ratios effecteurs : cibles (E:T) définis dans une culture cellulaire à 96 puits. La lyse des cellules cibles a été évaluée par microscopie et quantifiée par des tests de viabilité WST-1.

2.3. Expériences in vivo

Des cellules PDAC exprimant la luciférase Firefly ont été établies en transduisant des cellules. Les cellules ont été triées pour l'expression d'une protéine fluorescente verte; la GFP (Green Fluorescent Protein) puis développées in vitro. Ensuite, 50 μL de 1×10^5 des cellules PDAC-Luc ont été injectées chirurgicalement dans le pancréas de souris NSG (Charles River) âgées de 6 à 8 semaines. Pour effectuer la chirurgie, les souris ont été anesthésiées avec de l'isoflurane (2%) et une incision a été pratiquée dans le flanc gauche de la peau après sédation et analgésie. Ensuite, une deuxième incision à travers le péritoine a été réalisée et la rate avec le pancréas adjacent a été visualisée pour l'injection de cellules PDAC.

Après avoir fermé le péritoine avec des sutures, la peau a été fermée par des agrafes chirurgicales. Les souris ont été anesthésiées avec de l'isoflurane (2 %) et injectées par voie intrapéritonéale avec 150 mg/kg de luciférine dilué à 15 mg/mL dans du PBS. Des images séquentielles ont été obtenues après l'injection de luciférine toutes les 30 secondes (émission de lumière maximale, environ 20 minutes après l'injection de luciférine). L'activité de la luciférase est exprimée en photons par seconde par centimètre carré par stéradian ($\text{p/s}^{-1} \text{cm}^{-2} \text{sr}^{-1}$). Une fois que les tumeurs sont devenues détectables, les souris ont été randomisées pour divers traitements.

2.4. Immunohistochimie

La coloration par immunohistochimie a été réalisée sur des coupes de 2, 5 $\mu\text{mol} / \text{L}$ de PDAC et de tissus normaux sur un microréseau de tissus. Les coupes ont été déparaffinées, hydratées et chargées sur le Discovery XT.

La récupération de l'antigène a été effectuée à l'aide d'une solution tampon de citrate. Les peroxydases endogènes ont été désactivées en utilisant le réactif H₂O₂. Le mAb BAC2 a déjà été utilisé pour détecter spécifiquement CEACAM7 par immunoloration. L'anticorps primaire BAC2 a donc été appliqué, incubé pendant 20 minutes et détecté à l'aide d'un anticorps secondaire anti-souris et du kit de détection ChromaMap DAB (Ventana). Les tissus ont été contre-colorés avec de l'hématoxyline et une analyse d'image a été effectuée.

2.5. Génération de cellules CAR-T

Des particules lentivirales ont été produites par transfection des constructions lentivirales dans des cellules rénales embryonnaires humaines HEK293FT. Les cellules ont été transfectées avec les plasmides pRRL-SIN-EF1 α -WPRE, pMDL, pREV et pVSVG en utilisant FugeneHD (Promega). Des cellules T humaines de volontaires sains ont été obtenues par purification Ficoll-Pacque de cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) à partir de sang total de donneur normal. Les PBMC ont été encore activés pendant 24 heures avec des billes magnétiques recouvertes de CD3/CD28 avant l'infection. Le lentivirus concentré a été appliqué sur les lymphocytes T humains activés en présence de 5 μ g/mL de sulfate de protamine et de 50 UI/mL d'IL2 (R&D) et centrifugé à 1 000 \times g pendant 2 heures à 32°C.

Le niveau d'expression de CAR 2869 et mutant a été déterminé par cytométrie en flux avec un anticorps anti-FLAG marqué à l'Alexa Fluor 488. Les cellules CAR-T ont ensuite été développées en culture avec la même concentration d'IL2, et utilisées pour un travail *in vitro* et *in vivo* entre 5 et 14 jours après l'isolement des cellules T.

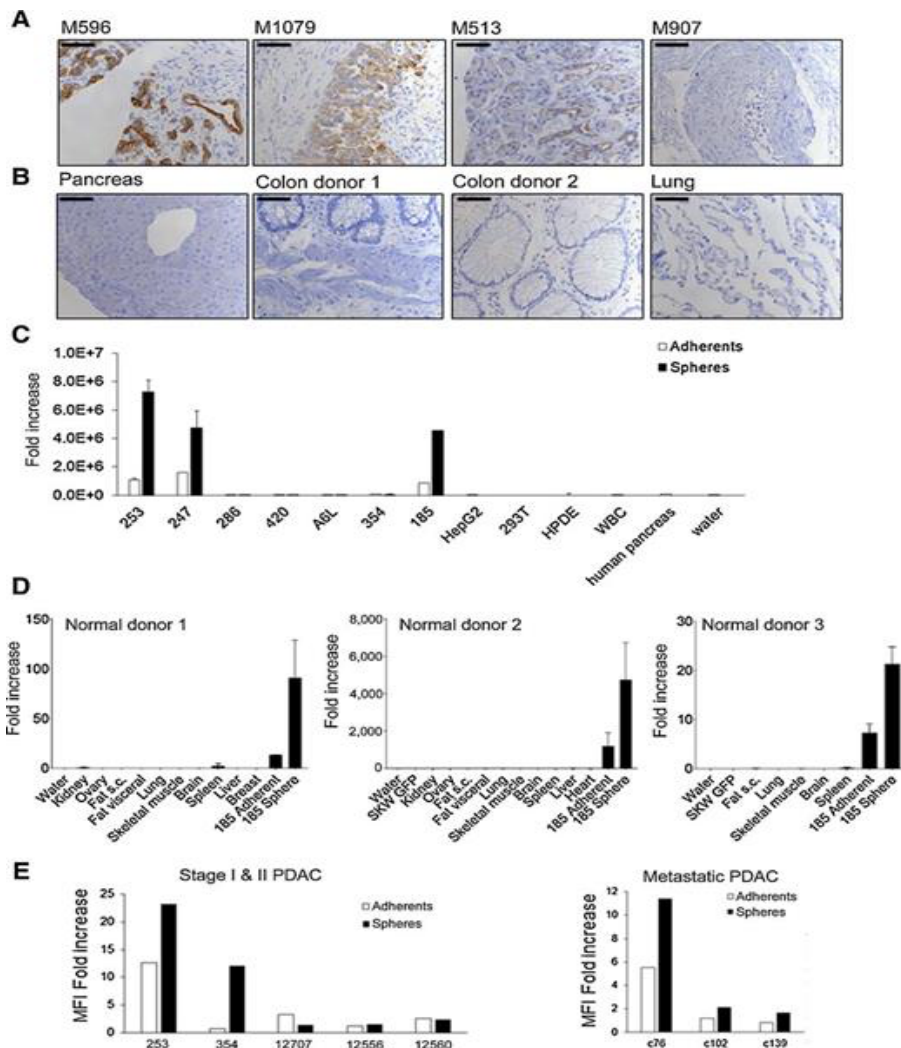
D. Résultats

1. Immunoloration

Pour évaluer les modèles d'expression de la protéine CEACAM7 dans le PDAC, une immunoloration a été réalisée sur un panel de coupes de tumeurs humaines. Le mAb BAC2 montre une liaison spécifique à CEACAM7 et ne montre aucune réactivité contre les autres membres de la famille CEA (78), et a donc été utilisé pour tous les travaux d'immunoloration. L'expression a été clairement visualisée dans le composant épithélial des tumeurs PDAC, sans coloration du stroma ou des vaisseaux sanguins.

Les figures 19.A et 19.B représentent respectivement un panel de coupes tumorales PDAC et de tissus humains normaux colorés avec l'anticorps BAC2 spécifique de CEACAM7 (échelle = 50 μ m). Le pancréas et le côlon sont les seuls tissus où l'expression de CEACAM7 a été démontrée. Pour évaluer l'expression de CEACAM7 dans les tissus normaux, une immunocoloration a été réalisée sur un panel de coupes de tissus normaux sur le même microréseau tissulaire que les coupes de tumeur PDAC. L'expression était indétectable dans le pancréas ou le côlon dans les mêmes conditions de coloration que celles utilisées pour les coupes PDAC.

Un premier qRT-PCR a été réalisé (Figure 19 .C) pour déterminer l'expression de l'ARNm de CEACAM7 dans les cultures adhérentes et sphériques de PDAC primaire, ainsi que dans les cultures non-PDAC et le pancréas humain. L'expression de l'ARNm de la β -actine a été utilisée comme contrôle. Les cultures de tumeurs PDAC dérivées de patients, contrairement aux lignées cellulaires, peuvent conserver les propriétés de la tumeur d'origine telles que l'hétérogénéité génétique et l'expression de l'antigène qui ne sont pas un artefact de la culture à long terme.



HPDE : humans pancreas-derived epithelial cells

WBC : White blood cells

Figure 19 : Expression de CEACAM7 dans PDAC

Le transcrite CEACAM7 s'est avéré être régulé positivement dans trois des sept cultures PDAC primaires testées, avec une faible expression dans le pancréas humain et aucune expression détectable dans les cellules sanguines ni dans les types de cellules non PDAC . Il a été démontré dans plusieurs études que le compartiment de cellules souches cancéreuses (CSC) entraîne la chimiorésistance, les métastases, la progression de la maladie et la rechute. Ainsi toute thérapie développée contre le PDAC doit cibler ce sous-ensemble de cellules pour une correction durable de la maladie (81). Des cultures de sphères non adhérentes ont été générées à partir de toutes les cultures de cellules PDAC primaires pour enrichir le composant CSC (82).

De manière significative, l'expression du transcrit CEACAM7 a été systématiquement augmentée dans les cultures de sphères enrichies en CSC par rapport aux cultures adhérentes différenciées, ce qui suggère un potentiel de ciblage du compartiment clé du CSC.

Un second qRT-PCR (Figure 19.D) a été réalisé pour déterminer l'expression de l'ARNm de CEACAM7 dans un panel de tissus normaux provenant de trois donneurs humains différents. L'expression de l'ARNm de la β -actine a été utilisée comme contrôle. Aucune expression détectable n'a été observée dans aucun de ces tissus, par rapport aux cultures primaires de PDAC. Les modèles d'expression du transcrit de CEACAM7 se sont donc avérés cohérents avec les résultats de l'immunomarquage ainsi qu'avec les études précédentes analysant les modèles d'expression de CEACAM7. Ces données n'excluent pas l'expression de CEACAM7 dans le pancréas et le côlon, mais suggèrent une expression d'antigène significativement plus faible par rapport à PDAC, ce qui suggère qu'une régulation positive de la protéine CEACAM7 dans PDAC peut se produire au niveau post-transcriptionnel.

Une cytométrie en flux a permis d'établir si le transcrit CEACAM7 était corrélé à l'expression de la surface cellulaire de la protéine CEACAM7 dans PDAC. (Figure 19.E) À l'aide de cultures primaires de patients de stade I à II (à gauche) ou de patients atteints d'une maladie métastatique à un stade avancé (à droite). Des populations adhérentes et des cultures de sphères enrichies en CSC ont été générées. Les valeurs sont présentées sous forme d'augmentation de l'intensité de fluorescence médiane (MFI) par rapport aux témoins non colorés. La cytométrie en flux utilisant des surnageants d'hybridome 2869 a montré une expression élevée de CEACAM7 dans l'une des trois cultures métastatiques et deux des cinq cultures PDAC de stade I-II. Conformément aux données qRT-PCR, l'expression de CEACAM7 a été systématiquement augmentée dans les sphères par rapport aux cultures adhérentes, soulignant le potentiel de cibler le compartiment CSC.

2. Génération de cellules CAR-T dérivées de 2869

La spécificité de l'hybridome 2869 contre CEACAM7 a été par la suite étudiée. Les cultures PDAC 354 et c102, qui présentaient une expression indétectable de CEACAM7 lorsqu'elles étaient cultivées sous forme de cultures adhérentes (Figure 19.E), ont été modifiées pour exprimer la GFP et la luciférase (354GL et c102GL) afin de permettre le suivi *in vitro* et *in vivo*. Pour évaluer la spécificité de l'anticorps 2869 vis-à-vis de la protéine CEACAM7, les cellules 354GL et c102GL ont ensuite été modifiées davantage pour exprimer de manière stable CEACAM7.

Le transfert Western utilisant des surnageants d'hybridomes 2869 a montré de fortes bandes de taille attendue dans les cellules modifiées, montrant une expression ectopique réussie de CEACAM7, avec une expression plus forte dans c102GL que dans 354GL (Figure 20.A). La cytométrie en flux des deux types de cellules a montré la liaison de 2869 surnageants d'hybridome spécifiquement dans les cellules modifiées par CEACAM7, suggérant une localisation membranaire réussie de CEACAM7 ectopique (Figure 20.B). Conformément aux données de Western blot, une expression plus forte de CEACAM7 a été observée sur le c102GL comparé aux cellules 354GL.

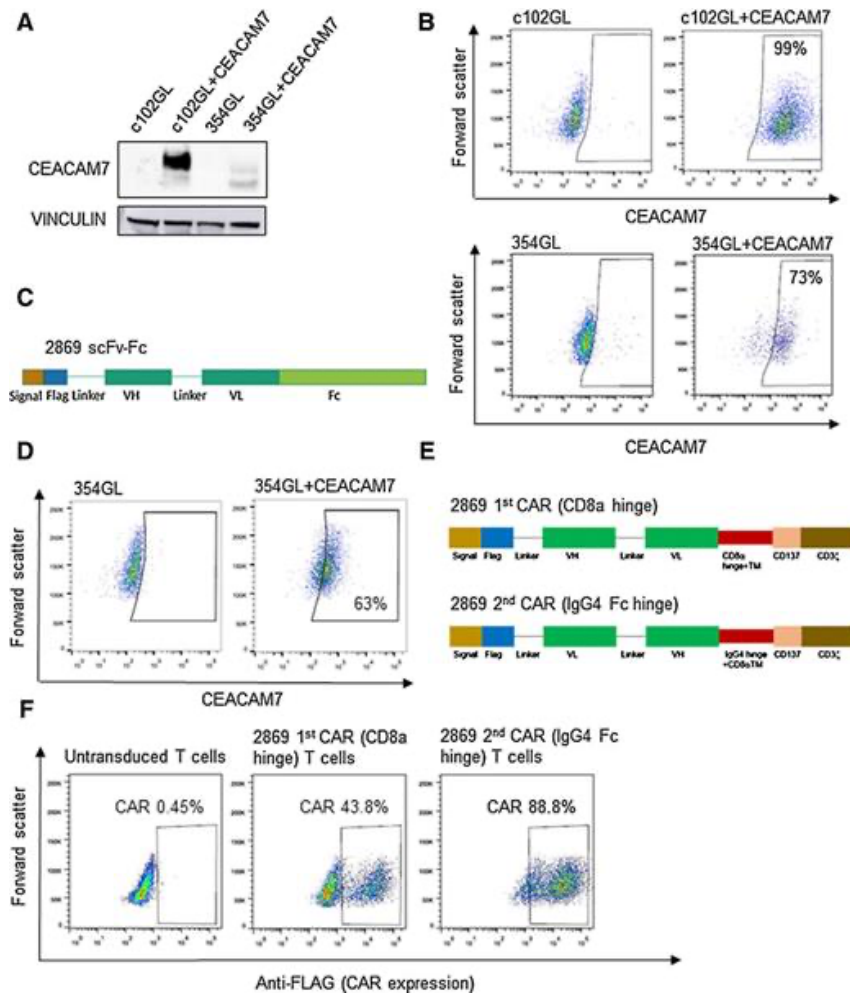


Figure 20 : Développement de CAR-T cells dérivées de 2869

Pour évaluer la pertinence de cet hybridome pour le développement de CAR, un scFv a été généré sur la base des régions variables des chaînes lourdes et légères de l'anticorps 2869, et exprimé dans le cadre avec un fragment Fc dérivé d'IgG1 humain pour permettre la détection avec un anti-anticorps Fc (Figure 20.C). La fusion 2869 scFv-Fc a été transfectée dans des cellules 293T, et les surnageants contenant la protéine sécrétée ont été utilisés pour la cytométrie en flux sur 354GL modifié et non modifié. Le scFv-Fc 2869 a montré un schéma de liaison similaire aux surnageants d'hybridome 2869, avec une liaison spécifique aux cellules exprimant CEACAM7 de manière ectopique, démontrant le potentiel du scFv 2869 pour le développement de CAR ciblé CEACAM7 (Figure 20.D).

Des récepteurs antigéniques chimériques de deuxième génération ont ensuite été construits en fusionnant le scFv 2869 à un domaine charnière et à des domaines transmembranaires CD8 α , en phase avec le domaine costimulateur CD137 (4-1BB) et le domaine d'activation CD3 ζ . Plusieurs études ont montré que la distance entre le domaine de liaison à l'épitope et la surface des cellules T peut avoir un impact significatif sur la fonction des cellules T CAR (83). Deux CAR ont été conçus avec soit une charnière dérivée de CD8 α de 45 acides aminés, soit une charnière dérivée d'IgG4 de 12 acides aminés (Figure 20.E).

Les deux CAR pourraient être transduits efficacement dans des lymphocytes T humains primaires avec une expression comprise entre 40 % et 90 %, bien que le plus petit CAR (charnière IgG4) ait constamment montré une expression plus élevée, conformément aux études précédentes montrant que l'efficacité de la transduction lentivirale peut être améliorée par des constructions plus petites (Figure 20.F) (84).

3. Activité spécifique des cellules 2869 CAR-T contre les cibles exprimant CEACAM7

La spécificité et l'efficacité de 2869 CAR contre les cibles exprimant CEACAM7 ont ensuite été étudiées. Des cellules ectopiques exprimant CEACAM7 354GL et c102GL ont été utilisées comme cibles de lymphocytes T CAR, avec des cellules non modifiées comme contrôle négatif. Les cellules T non modifiées ou modifiées pour exprimer l'un ou l'autre des 2869 CAR ont été superposées sur une monocouche de cellules cibles PDAC à un rapport E:T de 5: 1. La viabilité des cellules cibles a été initialement évaluée par l'expression de la GFP. La lyse de cellules PDAC cibles exprimant CEACAM7 a été observée après coculture avec l'un des types de cellules T 2869 CAR (Figure 21.A.B). Les cellules non modifiées n'ont pas subi de lyse.

La quantification de la viabilité des cellules cibles à l'aide de WST-1 a montré qu'aucun des 2869 types de cellules CAR-T n'avait d'effet sur les cellules PDAC non modifiées, mais diminuait la viabilité des cibles exprimant CEACAM7 lorsqu'elles étaient appliquées à la fois à 5: 1 et 1: 1 E: T ratios. La destruction cytotoxique semblait dépendre de la densité de l'antigène, avec une cytotoxicité plus élevée observée contre c102GL que 354GL, compatible avec une expression plus élevée de CEACAM7 sur les cellules c102GL.

Le CAR 2869 plus petit (charnière IgG4) avait une efficacité cytotoxique légère mais significativement plus élevée lorsque les cellules CAR-T étaient appliquées au rapport E: T de 5: 1 sur l'un ou l'autre des types de cellules cibles (Figure 21.C et D). Les cellules 2869 CAR-T peuvent donc cibler spécifiquement les cellules exprimant CEACAM7, sans effet sur les cellules qui n'expriment pas l'antigène cible.

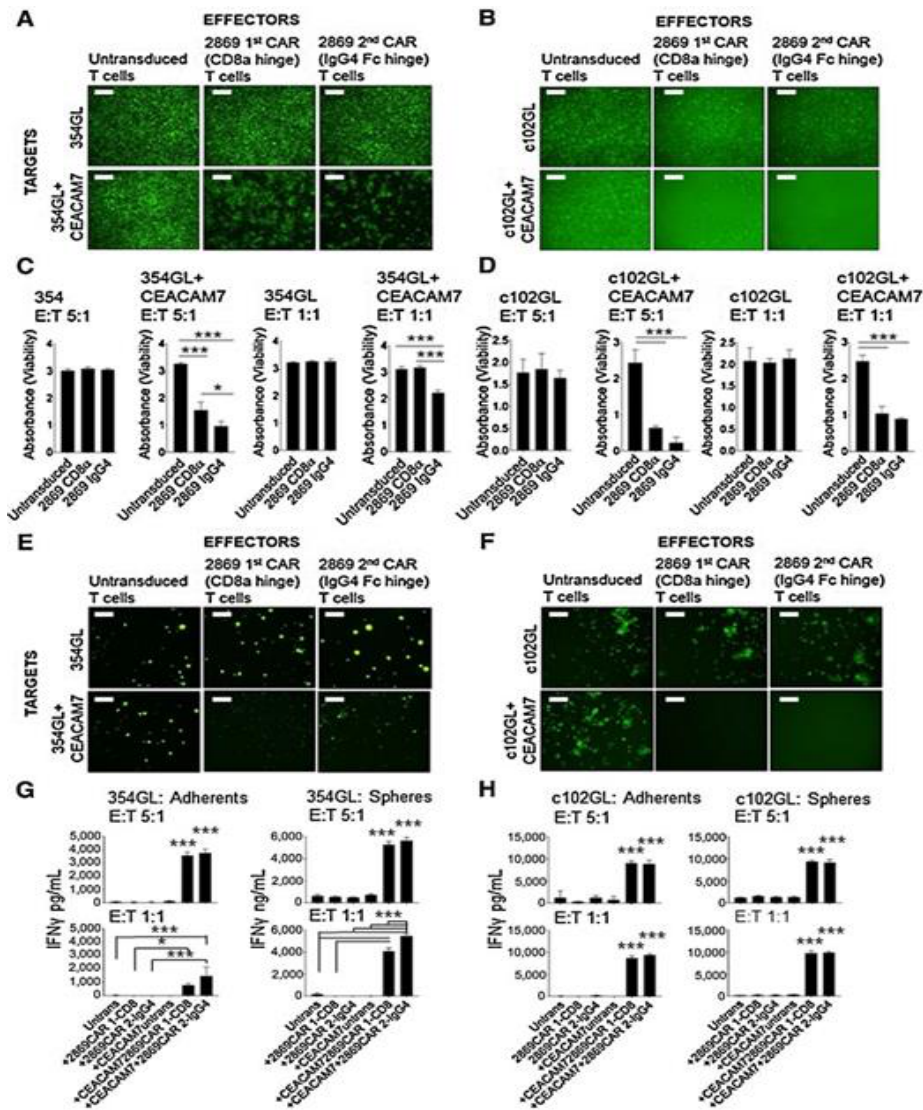


Figure 21 : Efficacité in vitro des cellules 2869 CAR-T

Outre l'enrichissement du compartiment CSC, les cultures sphériques sont également caractérisées par une matrice extracellulaire dense qui peut servir de barrière aux cellules effectrices (85).

Les dosages cytotoxiques contre les cultures de sphères peuvent donc être informatifs dans (i) le ciblage des lymphocytes T CAR du compartiment CSC et (ii) la capacité des lymphocytes T à pénétrer une barrière qui récapitule les caractéristiques physiques du microenvironnement tumoral (TME). Des cultures de sphères de cellules 354GL et c102GL avec ou sans expression de CEACAM7 ont donc étéensemencées et laissées se former pendant 7 jours, après quoi des cellules T effectrices ont été ajoutées à un rapport E:T de 5: 1. Lors de la coculture de sphères avec des cellules T exprimant soit 2869 CAR, aucun effet n'a été observé sur les sphères non modifiées, mais une lyse complète des sphères exprimant CEACAM7 a été observée. Comme pour les cibles adhérentes, la destruction cytotoxique dépendait de la densité, avec une clairance plus efficace des sphères c102GL exprimant CEACAM7 que des sphères 354GL (Figure 21 .E et F). Les cellules 2869 CAR-T peuvent donc cibler des cultures de sphères PDAC exprimant CEACAM7, dans des conditions *in vitro* qui enrichissent le CSC et forment une barrière stromale.

Pour comparer l'activation des cellules CAR-T de manière générale dans les deux types de cellules cibles dans des conditions adhérentes et sphériques, des cocultures parallèles ont été mises en place avec des cellules cibles c102GL et 354GL exprimant CEACAM7 et non modifiées cultivées à la fois comme adhérentes et sphères, cocultivées avec des cellules T effectrices à E :T ratios de 5:1 et 1:1. Les surnageants de chaque coculture individuelle ont été testés pour la sécrétion d'IFN γ . Une sécrétion significativement plus élevée d'IFN γ a été observée à partir de cellules T exprimant soit 2869 CAR lorsqu'elles étaient exprimées avec des cibles exprimant CEACAM7, mais pas avec des cellules cibles non modifiées. Des schémas similaires de sécrétion d'IFN γ ont été observés lors d'une coculture avec des cibles sphériques ou adhérentes, tandis que les cellules T non modifiées n'ont montré aucune sécrétion d'IFN γ dans aucune condition (Figure 21 G et H). Ces données suggèrent que les cellules 2869 CAR-T sont activées spécifiquement et efficacement par l'antigène cible dans le contexte d'une culture adhérente ou sphérique.

Pour évaluer si l'activité CAR-T était maintenue in vivo , des cellules 354GL ont été implantés orthotopiquement (avec et sans CEACAM7 ectopique) pour générer un modèle de xénogreffe de stade I/II PDAC. Les tumeurs se sont greffées et se sont développées rapidement et ont été traitées avec deux doses de cellules CAR-T 2869 aux jours 6 et 13 après l'implantation de la tumeur.

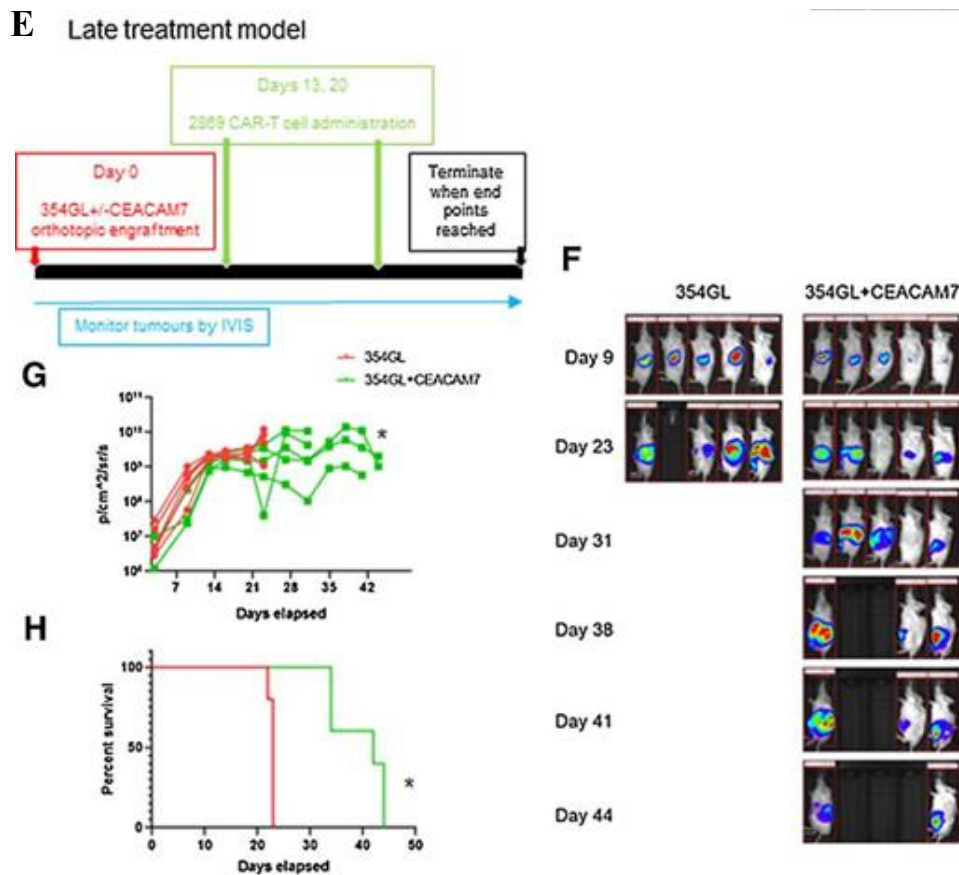


Figure 22 : Efficacité in vivo des cellules 2869 CAR-T

Nous avons souhaité étudier l'efficacité des cellules 2869 CAR-T contre des tumeurs plus avancées. Nous avons donc établi un deuxième modèle de xénogreffe avec des cellules 354GL±CEACAM7 comme précédemment, et surveillé la croissance tumorale in vivo . Lorsque les tumeurs avaient atteint une taille approchant le critère d'évaluation autorisé, nous avons administré deux doses de 2869 cellules CAR-T aux jours 13 et 20 (Figure 22.E). Tous les animaux de la cohorte 354GL ont succombé rapidement à une maladie progressive, tandis qu'une stabilisation tumorale et une survie prolongée de manière significative ont été observées chez quatre des cinq animaux de la cohorte 354GL + CEACAM7 (Figure 22.G et

F). Ces données démontrent la spécificité de l'antigène *in vivo* des cellules 2869 CAR-T contre des modèles de xénogreffe générés à partir de cultures primaires de PDAC dérivées de patients.

4. Activité *in vivo* des cellules 2869 CAR-T contre les xénogreffes exprimant CEACAM7

Des cellules PDAC c76GL, cultivées sous forme de cultures adhérentes, ont été implantées orthotopiquement dans des souris NSG. Cette culture cellulaire, dérivée du sang d'un patient atteint de PDAC avec une maladie métastatique à un stade avancé, a été choisie pour son agressivité, sa croissance rapide et ses métastases étendues. Les tumeurs ont été surveillées jusqu'à ce qu'elles atteignent une taille > 0,5 cm et que des métastases détectables se soient développées, afin de modéliser avec précision la présentation de la maladie à un stade avancé chez des patients humains. A ce stade, les animaux ont reçu une dose unique de 5×10^6 cellules CAR-T mutantes ou 2869 cellules CAR-T (Figure 23.A).

Une progression continue des tumeurs a été observée chez cinq des cinq animaux traités avec des cellules CAR-T mutantes, mais seulement chez deux des cinq animaux qui ont reçu 2869 cellules CAR-T. Une régression complète des tumeurs primaires et des métastases hépatiques a été observée chez les animaux répondants de la cohorte de cellules T CAR 2869 ($P = 0,04$; Figure 23.B et C).

Il convient de noter que la survie globale de la cohorte de 2869 traités par CAR-T a été significativement améliorée par rapport à la cohorte mutante traitée par CAR-T (survie moyenne 58,6 jours contre 27,4 jours ; survie médiane 61 jours contre 29 jours ; $P < 0,05$). Les trois souris survivantes de la cohorte 2869 CAR ont commencé à présenter des symptômes de GvHD, notamment une perte de poids, une mobilité réduite et une posture voûtée, et ont donc été euthanasiées 61 jours et 84 jours après l'administration des lymphocytes T (Fig. 7D). L'examen morphologique macroscopique a confirmé l'absence de tumeur. Ces résultats démontrent donc que les cellules 2869 CAR-T sont capables de médier la régression complète des grosses tumeurs et des métastases dans un modèle de xénogreffe agressif et métastatique avec une présentation similaire à la maladie humaine à un stade avancé.

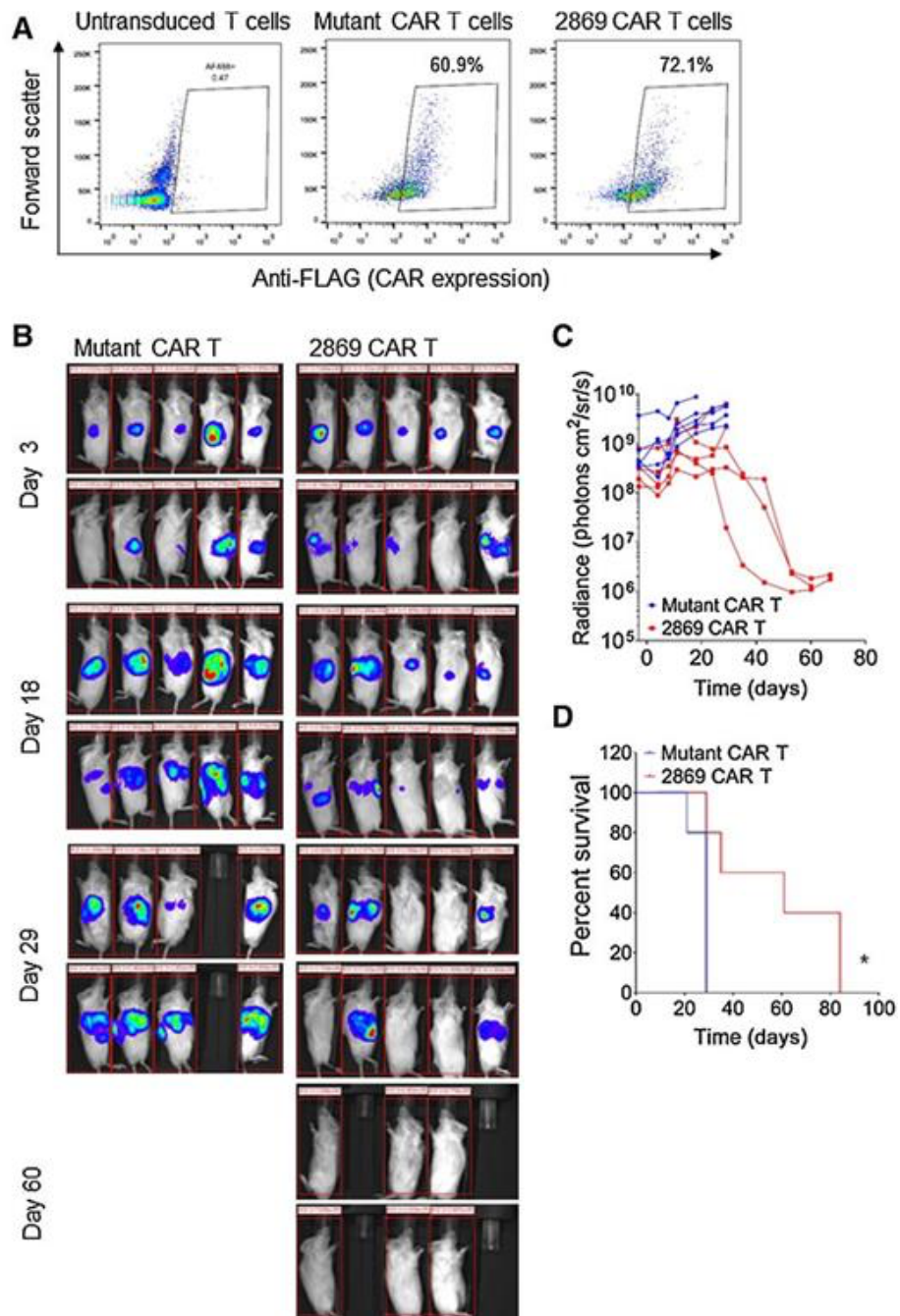


Figure 23 : Les cellules CAR-T ciblant les tumeurs xéno greffées disséminées in vivo

CONCLUSION

La PDAC est largement réfractaire aux thérapies conventionnelles, qui prolongent au mieux la survie de quelques mois, il s'agit donc d'une maladie dont les besoins ne sont pas satisfaits. Au niveau moléculaire, les tumeurs PDAC sont caractérisées par une hétérogénéité génétique considérable (86) et la présence d'un compartiment de cellules souches cancéreuses (87), qui contribuent ensemble à la progression de la maladie et à la résistance à la chimiothérapie.

La découverte d'une cible thérapeutique pouvant agir spécifiquement sur le compartiment de cellules souches cancéreuses est une avancée majeure dans le développement de CAR-T cells. En effet, cela permet d'agir significativement sur les cellules cancéreuses en évitant toute résistance au traitement. L'expression de l'antigène CEACAM7 a été clairement visualisée dans le composant épithélial des tumeurs PDAC, sans coloration du stroma ou des vaisseaux sanguins. Ainsi la production de CAR-T cells CEACAM7 dirigés contre cet antigène permettra une action ciblée diminuant considérablement les effets hors cible.

Cependant, comme cela a été démontré précédemment, la complexité de la thérapie génique par CAR-T cells nécessite la mise en place de nombreux efforts cliniques et réglementaires. À cet égard, un processus de suivi unique et harmonisé a été mis en place par le consortium CARAT (Chimeric Antigen Receptors for Advanced Therapies) financé par HORIZON 2020. Il s'agit d'un programme de recherche et d'innovation de l'Union européenne permettant la synergie de l'excellence scientifique. Le consortium CARAT est composé de huit partenaires situés en France, en Allemagne, en Italie et au Royaume-Uni. Grâce à ce partenariat l'Europe pourra se placer en tête des thérapies CAR-T cells. L'harmonisation des données scientifiques concernant les CAR-T cells permettra d'accélérer le développement et la mise sur le marché de thérapies innovantes apportant des progrès majeurs en médecine personnalisée.

En juin 2023, le Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille a mis en évidence l'association potentielle des sites d'ubiquitination avec la survie globale des patients. Quatre marqueurs pronostiques prometteurs, PDCD6IP K501, ALDOA K330, NACA K142 et KRT17 K321 ont été identifiés. Ces marqueurs pourront prédire la sensibilité à des médicaments spécifiques et, surtout, représenter de nouvelles cibles moléculaires potentielles dans les tumeurs résistantes (88).

Bibliographie

1. Hu JX, Zhao CF, Chen WB, Liu QC, Li QW, Lin YY, et al. Pancreatic cancer: A review of epidemiology, trend, and risk factors. *World J Gastroenterol*. 21 juill 2021;27(27):4298-321.
2. McGuigan A, Kelly P, Turkington RC, Jones C, Coleman HG, McCain RS. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World J Gastroenterol*. 21 nov 2018;24(43):4846-61.
3. Kröger N, Gribben J, Chabannon C, Yakoub-Agha I, Einsele H, éditeurs. *The EBMT/EHA CAR-T Cell Handbook* [Internet]. Cham (CH): Springer; 2022 [cité 16 févr 2023]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK584154/>
4. Cancer du Pancréas : les informations essentielles sur cette maladie [Internet]. Acobiom. [cité 16 févr 2023]. Disponible sur: <https://www.acobiom.com/fr/cancer-du-pancreas/>
5. Ashley A. Vareedayah,, al. Pancreatic Adenocarcinoma. juin 2018;230-5.
6. ANATOMIE ET RADIOANATOMIE DU PANCREAS [Internet]. [cité 16 févr 2023]. Disponible sur: http://memoires.scd.univ-tours.fr/Medecine/Theses/2012_Medecine_ParentNicolas/web/html/indexbebf.html?option=com_content&view=article&id=3&Itemid=47
7. Lee S. Tumeurs cancéreuses du pancréas [Internet]. Société canadienne du cancer. [cité 16 févr 2023]. Disponible sur: <https://cancer.ca/fr/cancer-information/cancer-types/pancreatic/what-is-pancreatic-cancer/cancerous-tumours>

8. The Renin-Angiotensin System: Current Research Progress in The Pancreas [Internet]. [cité 16 févr 2023]. Disponible sur: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-90-481-9060-7>
9. Facteurs de risque de l'adénocarcinome du pancréas : prévention et dépistage [Internet]. FMC-HGE. [cité 16 févr 2023]. Disponible sur: <https://www.fmcgastro.org/texte-postu/postu-2021-paris/facteurs-de-risque-de-ladenocarcinome-du-pancreas-prevention-et-depistage/>
10. Buscail L, Bournet B, Cordelier P. Le cancer du pancréas. Bull Académie Natl Médecine. déc 2012;196(9):1819-28.
11. Buache É, Rio MC. Le stroma tumoral: Un terreau fertile pour la cellule cancéreuse. médecine/sciences. avr 2014;30(4):385-90.
12. Gu Y, Lu H, Boisson-Vidal C, Li H, Bousquet G, Janin A, et al. La résistance aux traitements antiangiogéniques - Une actualité clinique et scientifique. médecine/sciences. 1 avr 2016;32(4):370-7.
13. Hasmim M, Messai Y, Noman MZ, Chouaib S. L'hypoxie tumorale: Un déterminant clé de la réactivité stromale et de la réponse antitumorale. médecine/sciences. avr 2014;30(4):422-8.
14. Vasseur S, Guillaumond F. L'adénocarcinome pancréatique : une tumeur dépendante des lipoprotéines. médecine/sciences. août 2015;31(8-9):728-30.
15. Ren B, Liu X, Suriawinata AA. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Precursor Lesions: Histopathology, Cytopathology, and Molecular Pathology. Am J Pathol. janv 2019;189(1):9-21.

16. Cancers du pancréas : comment est établi le diagnostic ? [Internet]. [cité 22 févr 2023]. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-pancreas/Le-diagnostic>
17. O’Kane GM, Ladak F, Gallinger S. Avancées dans la prise en charge de l’adénocarcinome canalaire pancréatique. *CMAJ Can Med Assoc J.* 30 août 2021;193(34):E1362-70.
18. Cancers du pancréas : quels traitements ? - Cancer du pancréas [Internet]. [cité 25 févr 2023]. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-pancreas/Les-traitements>
19. Gustave Roussy: cancer du pancréas [Internet]. Gustave Roussy. [cité 26 févr 2023]. Disponible sur: <https://www.gustaveroussy.fr/fr/cancer-du-pancreas>
20. Traitement du cancer du pancréas (recommandations en cours de labellisation INCa - 2019) [Internet]. FMC-HGE. [cité 26 févr 2023]. Disponible sur: <https://www.fmcgastro.org/texte-postu/postu-2019-paris/traitement-du-cancer-du-pancreas-recommandations-en-cours-de-labellisation-inca-2019/>
21. Delpero JR, Boher JM, Sauvanet A, Le Treut YP, Sa-Cunha A, Mabrut JY, et al. Pancreatic adenocarcinoma with venous involvement: is up-front synchronous portal-superior mesenteric vein resection still justified? A survey of the Association Française de Chirurgie. *Ann Surg Oncol.* 2015;22(6):1874-83.
22. Neoptolemos JP, Stocken DD, Bassi C, Ghaneh P, Cunningham D, Goldstein D, et al. Adjuvant Chemotherapy With Fluorouracil Plus Folinic Acid vs Gemcitabine Following Pancreatic Cancer Resection: A Randomized Controlled Trial. *JAMA.* 8 sept 2010;304(10):1073-81.

23. Versteijne E, Vogel JA, Besselink MG, Busch ORC, Wilmink JW, Daams JG, et al. Meta-analysis comparing upfront surgery with neoadjuvant treatment in patients with resectable or borderline resectable pancreatic cancer. *Br J Surg*. juill 2018;105(8):946-58.
24. Acide folinique, Fluorouracile et Oxaliplatine (FOLFOX) pour les cancers [Internet]. [cité 26 févr 2023]. Disponible sur: <https://eurocholangionet.eu/wp-content/uploads/2022/02/FOLFOX-PIS.pdf>
25. Pietrasz D, Turrini O, Vendrely V, Simon JM, Hentic O, Coriat R, et al. How Does Chemoradiotherapy Following Induction FOLFIRINOX Improve the Results in Resected Borderline or Locally Advanced Pancreatic Adenocarcinoma? An AGEO-FRENCH Multicentric Cohort. *Ann Surg Oncol*. janv 2019;26(1):109-17.
26. Suker M, Beumer BR, Sadot E, Marthey L, Faris JE, Mellon EA, et al. A patient-level meta-analysis of FOLFIRINOX for locally advanced pancreatic cancer. *Lancet Oncol*. juin 2016;17(6):801-10.
27. Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, et al. Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine. *N Engl J Med*. 31 oct 2013;369(18):1691-703.
28. Oettle H, Neuhaus P, Hochhaus A, Hartmann JT, Gellert K, Ridwelski K, et al. Adjuvant Chemotherapy With Gemcitabine and Long-term Outcomes Among Patients With Resected Pancreatic Cancer: The CONKO-001 Randomized Trial. *JAMA*. 9 oct 2013;310(14):1473-81.
29. Cancer-du-pancreas-guide-pour-les-patients.pdf [Internet]. [cité 3 mars 2023]. Disponible sur: <https://www.esmo.org/content/download/6624/115167/file/fr-cancer-du-pancreas-guide-pour-les-patients.pdf>
30. EMA. Kymriah [Internet]. European Medicines Agency. 2018 [cité 29 janv 2022]. Disponible sur: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/kymriah>

31. yescarta-epar-public-assessment-report_en.pdf [Internet]. [cité 16 févr 2023]. Disponible sur: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/yescarta-epar-public-assessment-report_en.pdf
32. EMA. ICH M3 (R2) Non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials pharmaceuticals - Scientific guideline [Internet]. European Medicines Agency. 2018 [cité 17 févr 2023]. Disponible sur: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m3-r2-non-clinical-safety-studies-conduct-human-clinical-trials-pharmaceuticals-scientific>
33. EMA. ICH S7A Safety pharmacology studies for human pharmaceuticals - Scientific guideline [Internet]. European Medicines Agency. 2018 [cité 17 févr 2023]. Disponible sur: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-s7a-safety-pharmacology-studies-human-pharmaceuticals-scientific-guideline>
34. EMA. ICH S6 (R1) Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals - Scientific guideline [Internet]. European Medicines Agency. 2018 [cité 17 févr 2023]. Disponible sur: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-s6-r1-preclinical-safety-evaluation-biotechnology-derived-pharmaceuticals-scientific-guideline>
35. Bonnes pratiques de fabrication de médicaments à usage humain - ANSM [Internet]. [cité 17 févr 2023]. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/documents/referance/bonnes-pratiques-de-fabrication-de-medicaments-a-usage-humain>
36. Bonnes pratiques de laboratoire - ANSM [Internet]. [cité 17 févr 2023]. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/documents/referance/bonnes-pratiques-de-laboratoire>
37. Celis P. CAT--the new committee for advanced therapies at the European Medicines Agency. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. 1 janv 2010;53(1):9-13.

38. EMA. ICH E6 (R2) Good clinical practice [Internet]. European Medicines Agency. 2018 [cité 1 févr 2022]. Disponible sur: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-e6-r2-good-clinical-practice>
39. EMA. ICH E8 General considerations for clinical studies [Internet]. European Medicines Agency. 2018 [cité 1 févr 2022]. Disponible sur: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-e8-general-considerations-clinical-studies>
40. WMA - The World Medical Association-Déclaration d'Helsinki de l'AMM – Principes éthiques applicables à la recherche médicale impliquant des êtres humains [Internet]. [cité 18 févr 2023]. Disponible sur: <https://www.wma.net/fr/policies-post/declaration-dhelsinki-de-lamm-principes-ethiques-applicables-a-la-recherche-medicale-impliquant-des-etres-humains/>
41. Règlement n°536/2014 du parlement Européen [Internet]. [cité 17 févr 2023]. Disponible sur: https://health.ec.europa.eu/system/files/2016-11/reg_2014_536_fr_0.pdf
42. Hartmann J, Schüßler-Lenz M, Bondanza A, Buchholz CJ. Clinical development of CAR-T cells—challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts. *EMBO Mol Med.* sept 2017;9(9):1183-97.
43. Sharpe M, Mount N. Genetically modified T cells in cancer therapy: opportunities and challenges. *Dis Model Mech.* avr 2015;8(4):337-50.
44. Research C for DE and. Investigational New Drug (IND) Application [Internet]. FDA. FDA; 2022 [cité 18 févr 2023]. Disponible sur: <https://www.fda.gov/drugs/types-applications/investigational-new-drug-ind-application>

45. Clinical Development and Manufacture of Chimeric Antigen Receptor T cells and the Role of Leukapheresis | touchONCOLOGY. Href [Internet]. 11 mai 2017 [cité 22 févr 2023]; Disponible sur: <https://touchoncology.com/immunotherapy/journal-articles/clinical-development-and-manufacture-of-chimeric-antigen-receptor-t-cells-and-the-role-of-leukapheresis/>
46. Rubio MT, Galaine J, Borg C, Daguindau É. Biologie, concepts et principes des CAR-T cells. Bull Cancer (Paris). déc 2018;105:S135-46.
47. Développement clinique et fabrication de lymphocytes T chimériques récepteurs d'antigènes et rôle de la leucaphérèse [Internet]. Disponible sur: <https://touchoncology.com/immunotherapy/journal-articles/clinical-development-and-manufacture-of-chimeric-antigen-receptor-t-cells-and-the-role-of-leukapheresis/?fbclid=IwAR2lxT0oXtfWAEVOmy2N105BHx0Slqk2pfmN5hzDEtd9UkoS-igFzAwFaBs>
48. Abassi F. Enquête sur le circuit des CarT-cells en France et estimation du coût moyen de la prise en charge du patient traité par ces médicaments de thérapie innovante au CHU de Clermont-Ferrand.
49. Arrêté du 13 juillet 1998 relatif aux prescriptions générales applicables aux installations classées pour la protection de l'environnement soumises à déclaration sous l'une ou plusieurs des rubriques nos 4110, 4709, 4713, 4736 ou 4737 - Légifrance [Internet]. [cité 22 févr 2023]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000000756621>
50. Metz C, Dhib-Char M, Tilleul P, Charbonnier-Beaupel F. Implication du pharmacien dans la gestion des CAR-T cells. 2019;5.

51. Milone MC, Fish JD, Carpenito C, Carroll RG, Binder GK, Teachey D, et al. Chimeric Receptors Containing CD137 Signal Transduction Domains Mediate Enhanced Survival of T Cells and Increased Antileukemic Efficacy In Vivo. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* août 2009;17(8):1453-64.
52. Kawalekar OU, O'Connor RS, Fraietta JA, Guo L, McGettigan SE, Posey AD, et al. Distinct Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR-T Cells. *Immunity.* 16 févr 2016;44(2):380-90.
53. Donahue RE, Jin P, Bonifacino AC, Metzger ME, Ren J, Wang E, et al. Plerixafor (AMD3100) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mobilize different CD34+ cell populations based on global gene and microRNA expression signatures. *Blood.* 17 sept 2009;114(12):2530-41.
54. Kean LS, Sen S, Onabajo O, Singh K, Robertson J, Stempora L, et al. Significant mobilization of both conventional and regulatory T cells with AMD3100. *Blood.* 15 déc 2011;118(25):6580-90.
55. Gargett T, Brown MP. The inducible caspase-9 suicide gene system as a "safety switch" to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen receptor T cells. *Front Pharmacol.* 28 oct 2014;5:235.
56. Di Stasi A, Tey SK, Dotti G, Fujita Y, Kennedy-Nasser A, Martinez C, et al. Inducible Apoptosis as a Safety Switch for Adoptive Cell Therapy. *N Engl J Med.* 3 nov 2011;365(18):1673-83.
57. Ms K, Js M, H Y, Y C, Jy K, V C, et al. Redirection of genetically engineered CAR-T cells using bifunctional small molecules. *J Am Chem Soc [Internet].* 3 avr 2015 [cité 26 mars 2023];137(8). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25692571/>

58. Wu CY, Roybal KT, Puchner EM, Onuffer J, Lim WA. Remote control of therapeutic T cells through a small molecule-gated chimeric receptor. *Science*. 16 oct 2015;350(6258):aab4077.
59. DeFrancesco L. CAR-T's forge ahead, despite Juno deaths. *Nat Biotechnol*. 10 janv 2017;35(1):6-7.
60. Faire progresser la médecine plus rapidement [Internet]. [cité 27 mars 2023]. Disponible sur: <https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.aaa1470>
61. Renner M, Anliker B, Sanzenbacher R, Schuele S. Regulation of Clinical Trials with Advanced Therapy Medicinal Products in Germany. In: Galli MC, Serabian M, éditeurs. *Regulatory Aspects of Gene Therapy and Cell Therapy Products: A Global Perspective* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2015 [cité 27 mars 2023]. p. 87-101. (Advances in Experimental Medicine and Biology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-3-319-18618-4_5
62. Reul J, Frisch J, Engeland CE, Thalheimer FB, Hartmann J, Ungerechts G, et al. Tumor-Specific Delivery of Immune Checkpoint Inhibitors by Engineered AAV Vectors. *Front Oncol*. 14 févr 2019;9:52.
63. Mullard A. PRIME time at the EMA. *Nat Rev Drug Discov*. 1 avr 2017;16(4):226-8.
64. Kleeff J, Korc M, Apte M, La Vecchia C, Johnson CD, Biankin AV, et al. Pancreatic cancer. *Nat Rev Dis Primer*. 21 avr 2016;2(1):1-22.
65. Kamisawa T, Wood LD, Itoi T, Takaori K. Pancreatic cancer. *Lancet Lond Engl*. 2 juill 2016;388(10039):73-85.

66. Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, Grupp SA, Bagg A, et al. T Cells with Chimeric Antigen Receptors Have Potent Antitumor Effects and Can Establish Memory in Patients with Advanced Leukemia. *Sci Transl Med.* 10 août 2011;3(95):95ra73.
67. Newick K, O'Brien S, Moon E, Albelda SM. CAR-T Cell Therapy for Solid Tumors. *Annu Rev Med.* 2017;68(1):139-52.
68. Thistlethwaite FC, Gilham DE, Guest RD, Rothwell DG, Pillai M, Burt DJ, et al. The clinical efficacy of first-generation carcinoembryonic antigen (CEACAM5)-specific CAR-T cells is limited by poor persistence and transient pre-conditioning-dependent respiratory toxicity. *Cancer Immunol Immunother.* 2017;66(11):1425-36.
69. Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA. Case Report of a Serious Adverse Event Following the Administration of T Cells Transduced With a Chimeric Antigen Receptor Recognizing ERBB2. *Mol Ther.* avr 2010;18(4):843-51.
70. Lamers CH, Sleijfer S, van Steenbergen S, van Elzakker P, van Krimpen B, Groot C, et al. Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma With CAIX CAR-engineered T cells: Clinical Evaluation and Management of On-target Toxicity. *Mol Ther.* avr 2013;21(4):904-12.
71. Feng K, Liu Y, Guo Y, Qiu J, Wu Z, Dai H, et al. Phase I study of chimeric antigen receptor modified T cells in treating HER2-positive advanced biliary tract cancers and pancreatic cancers. *Protein Cell.* oct 2018;9(10):838-47.
72. Beatty GL, O'Hara MH, Lacey SF, Torigian DA, Nazimuddin F, Chen F, et al. Activity of Mesothelin-specific Chimeric Antigen Receptor T cells Against Pancreatic Carcinoma Metastases in a Phase 1 Trial. *Gastroenterology.* juill 2018;155(1):29-32.
73. Beatty GL, Haas AR, Maus MV, Torigian DA, Soulen MC, Plesa G, et al. Mesothelin-specific Chimeric Antigen Receptor mRNA-Engineered T cells Induce Anti-Tumor Activity in Solid Malignancies. *Cancer Immunol Res.* 1 févr 2014;2(2):112-20.

74. Raj D, Nikolaidi M, Garces I, Lorizio D, Castro NM, Caiafa SG, et al. CEACAM7 Is an Effective Target for CAR-T-cell Therapy of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 1 mars 2021;27(5):1538-52.
75. Hammarström S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol.* 1 avr 1999;9(2):67-81.
76. Tchoupa AK, Schuhmacher T, Hauck CR. Signaling by epithelial members of the CEACAM family – mucosal docking sites for pathogenic bacteria. *Cell Commun Signal CCS.* 15 avr 2014;12:27.
77. Bonsor DA, Beckett D, Sundberg EJ. Structure of the N-terminal dimerization domain of CEACAM7. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Commun.* 25 août 2015;71(Pt 9):1169-75.
78. Schölzel S, Zimmermann W, Schwarzkopf G, Grunert F, Rogaczewski B, Thompson J. Carcinoembryonic Antigen Family Members CEACAM6 and CEACAM7 Are Differentially Expressed in Normal Tissues and Oppositely Deregulated in Hyperplastic Colorectal Polyps and Early Adenomas. *Am J Pathol.* févr 2000;156(2):595-605.
79. Thompson J, Zimmermann W, Nollau P, Neumaier M, Weber-Arden J, Schrewe H, et al. CGM2, a member of the carcinoembryonic antigen gene family is down-regulated in colorectal carcinomas. *J Biol Chem.* 30 déc 1994;269(52):32924-31.
80. Raj D, Yang MH, Rodgers D, Hampton EN, Begum J, Mustafa A, et al. Switchable CAR-T cells mediate remission in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gut.* juin 2019;68(6):1052-64.
81. Valle S, Martin-Hijano L, Alcalá S, Alonso-Nocelo M, Sainz Jr. B. The Ever-Evolving Concept of the Cancer Stem Cell in Pancreatic Cancer. *Cancers.* févr 2018;10(2):33.

82. Bahmad HF, Cheaito K, Chalhoub RM, Hadadeh O, Monzer A, Ballout F, et al. Sphere-Formation Assay: Three-Dimensional in vitro Culturing of Prostate Cancer Stem/Progenitor Sphere-Forming Cells. *Front Oncol.* 28 août 2018;8:347.
83. James SE, Greenberg PD, Jensen MC, Lin Y, Wang J, Till BG, et al. Antigen sensitivity of CD22-specific chimeric T cell receptors is modulated by target epitope distance from the cell membrane. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 mai 2008;180(10):7028-38.
84. Canté-Barrett K, Mendes RD, Smits WK, van Helsdingen-van Wijk YM, Pieters R, Meijerink JPP. Lentiviral gene transfer into human and murine hematopoietic stem cells: size matters. *BMC Res Notes.* 16 juin 2016;9:312.
85. Olejniczak A, Szaryńska M, Kmiec Z. In vitro characterization of spheres derived from colorectal cancer cell lines. *Int J Oncol.* 1 févr 2018;52(2):599-612.
86. Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell.* 14 août 2017;32(2):185-203.e13.
87. Sancho P, Alcala S, Usachov V, Hermann PC, Sainz B. The ever-changing landscape of pancreatic cancer stem cells. *Pancreatology.* 1 juill 2016;16(4):489-96.
88. El Kaoutari A, Fraunhoffer NA, Audebert S, Camoin L, Berthois Y, Gayet O, et al. Pancreatic ductal adenocarcinoma ubiquitination profiling reveals specific prognostic and theranostic markers. *eBioMedicine.* juin 2023;92:104634.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.
- ❖ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.
- ❖ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.
- ❖ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

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

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