



**HAL**  
open science

## Biologie, concepts et principes des CAR-T cells

Marie-Thérèse Rubio, Jeanne Galaine, Christophe Borg, Étienne Daguindau

► **To cite this version:**

Marie-Thérèse Rubio, Jeanne Galaine, Christophe Borg, Étienne Daguindau. Biologie, concepts et principes des CAR-T cells. Bulletin du Cancer, 2018, 105 (Suppl. 2), pp.S135-S146. 10.1016/S0007-4551(19)30044-X . hal-02977206

**HAL Id: hal-02977206**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-02977206>**

Submitted on 20 Jul 2022

**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 4.0 International License

## Biologie, concepts et principes des CAR-T cells

Marie-Thérèse Rubio<sup>1,\*</sup>, Jeanne Galaine<sup>2</sup>, Christophe Borg<sup>3</sup>, Étienne Daguindau<sup>4</sup>

1. Service d'hématologie, CHRU Nancy, Hopital Brabois, et CNRS UMR 7365, Équipe 6, Biopole de L'Université de Lorraine, 54500 Vandœuvre-les-Nancy, France
2. EFS Bourgogne Franche Comté, Activité de médicaments de thérapie innovante, UMR1098 INSERM/UBFC/EFS, 25020 Besançon, France
3. Centre Hospitalo-Universitaire Régional de Besançon, service d'oncologie médicale, UMR1098 INSERM/UBFC/EFS, 25020 Besançon, France
4. Centre Hospitalo-Universitaire Régional de Besançon, service d'hématologie, UMR1098 INSERM/UBFC/EFS, 25020 Besançon, France

**\*Auteur correspondant.**

Marie-Thérèse Rubio  
mt\_rubio@hotmail.com

### Mots clés

Immunothérapie anti-tumorale  
Lymphocytes génétiquement modifiés  
Récepteur chimérique à l'antigène  
Activation lymphocytaire  
Échappement immunitaire

### ■ Résumé

Le développement de nouvelles approches d'immunothérapies anti-tumorales est en plein essor. Les avancées de la biologie moléculaire et le développement d'outils variés de manipulation génétique permettent de « reprogrammer » les lymphocytes T afin de leur faire exprimer un récepteur chimérique incluant la partie variable d'une immunoglobuline capable de reconnaître un antigène tumoral associée à l'expression de molécules induisant l'activation des lymphocytes T. Les lymphocytes T ainsi génétiquement modifiés, appelés « CAR (*chimeric antigen receptor*)-T cells », ont permis d'obtenir des résultats cliniques impressionnants dans le traitement des hémopathies lymphoïdes B en rechute ou réfractaires aux traitements conventionnels et sont en développement dans les tumeurs solides. Différentes générations de CAR-T cells ont été développées et les progrès technologiques permettent d'envisager des modulations des constructions géniques permettant d'optimiser encore l'efficacité et la tolérance des CAR-T cells. Le premier challenge de ces approches concerne l'identification de cibles antigéniques spécifiques des cellules tumorales afin de limiter les effets « *on target/off tumor* » et la perte d'expression de la cible. Des approches permettant de i) cibler plusieurs antigènes ou de ii) limiter la durée d'expression du CAR dans les lymphocytes ou de iii) détruire les CAR-T par l'intermédiaire d'un gène suicide sont en ce sens intéressantes. Le deuxième objectif d'amélioration concerne l'accessibilité des CAR-T cells aux sites tumoraux et l'inhibition des mécanismes d'échappement des cellules tumorales à la cytotoxicité des CAR-T cells. Cette problématique fait actuellement l'objet de recherche de stratégies innovantes qui devraient améliorer l'efficacité clinique des CAR-T cells, en particulier dans les tumeurs solides.

### Keywords

Tumor  
immunotherapy  
Genetically modified lymphocytes

### ■ Abstract

#### CAR-T cells: biology, concepts and principles

*The development of new anti-tumor immunotherapy approaches has recently dramatically increased. Progresses made in molecular biology and the development of various genetic*

Chimeric antigen  
receptor  
Lymphocyte activation  
Immune escape

*manipulation tools allow the “reprogramming” of T cells in order to make them express a chimeric receptor including the variable part of an immunoglobulin capable of recognizing a tumor antigen along with the expression of molecules involved in T-lymphocyte activation signaling. Genetically modified T-cells, called “CAR (chimeric antigen receptors) -T cells”, have yielded impressive clinical results in the treatment of relapsed or refractory lymphoid hematological malignancies after conventional treatments and are in development in solid tumors. Different generations of CAR-T cells have been developed and technological progress makes it possible to envisage modulations of gene constructs that could further optimize the efficacy and tolerance of CAR-T cells. The first challenge of these approaches concerns the identification of specific tumor antigen targets in order to limit the on-target/off-tumor effects and the loss of expression of the target. Approaches i) targeting several antigens or ii) limiting the duration of expression of CAR in lymphocytes or iii) destroying CAR-T cells by a suicide gene. Interesting approaches are the second objective of improvement concerns the accessibility of CAR-T cells to tumor sites and the control of the immune escape mechanisms of tumor cells to the cytotoxicity of CAR-T cells. This issue is currently under the way of search of innovative strategies that should improve the clinical effectiveness of CAR-T cells, especially in solid tumors.*

Cet article fait partie du numéro supplément *Les cellules CAR-T : une révolution thérapeutique ?* réalisé avec le soutien institutionnel des partenaires Gilead : Kite et Celgene.

## Introduction

Le développement de la thérapie cellulaire en oncologie, qui connaît depuis plusieurs décades des avancées remarquables, repose sur le concept « d’immunosurveillance des tumeurs ». Ainsi, une des illustrations les plus marquantes de ce concept est l’association significative entre la présence d’un infiltrat lymphocytaire T au sein des tumeurs (TILs) et un pronostic plus favorable [1]. A contrario, la présence de cellules immunosuppressives est quant à elle associée à un pronostic péjoratif [1]. L’équipe de Steven Rosenberg a été la première capable d’utiliser ces TILs à des fins thérapeutiques avec succès chez l’homme dans le cadre de mélanomes avancés [2].

Dans le cadre des hémopathies malignes, l’allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) représente une autre approche d’immunothérapie cellulaire qui a démontré le potentiel anti-tumoral des cellules immunitaires du donneur, en particulier des lymphocytes T activés après reconnaissance d’antigènes exprimés par des cellules tumorales du receveur.

Les avancées de la biologie moléculaire dans les années 1970 ont été associées au développement d’outils de manipulation génétique et ont permis des transfections géniques efficaces dans des cellules souches hématopoïétiques ou des lymphocytes matures. Dans le contexte de l’immunothérapie anti-tumorale, ces outils ont été utilisés pour modifier génétiquement des lymphocytes T et leur faire exprimer des gènes codant pour un récepteur transgénique permettant leur activation après reconnaissance d’un antigène tumoral. Ces récepteurs transgéniques peuvent correspondre à un récepteur de lymphocyte T sélectionné pour sa reconnaissance d’un antigène tumoral (TCR Tg) ou un récepteur à l’antigène chimérique (CAR).

La reprogrammation d’un lymphocyte T par un TCR Tg est possible par transfert de gènes des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  d’un TCR spécifique d’un antigène tumoral isolé à partir d’un clone T issu de patient ayant développé une réponse immune vis-à-vis de l’antigène d’intérêt. Les premières études cliniques évaluant le transfert adoptif de cellules génétiquement modifiées avec un TCR Tg ont ciblé l’antigène partagé MART-1 exprimé sur certaines cellules tumorales, mais également dans certains tissus sains. Ce premier essai clinique a montré une bonne tolérance mais un manque d’efficacité compte tenu de la faible affinité du TCR Tg [3]. Des réponses cliniques durables ont pu ensuite être obtenues avec un TCR de meilleure affinité pour MART-1 ou avec des TCR Tg ciblant ACE ou NY-ESO1, au prix d’une plus grande toxicité [4]. L’utilisation de TCR expose également au risque de reconnaissance croisée d’antigènes (*epitope mimicry*) comme cela fut observé dans le cadre de l’utilisation de TCR ciblant MAGE-A3 : reconnaissance croisée de MAGE-A12 au niveau cérébral responsable de tableau de leucoencéphalopathie nécrotique [5]. La particularité de ces TCR Tg est la restriction à un phénotype HLA dans lequel le peptide est présenté. Ceci limite donc l’utilisation des TCR Tg aux patients exprimant des molécules du CMH reconnues par le TCR Tg. Un autre paramètre limitant le développement des TCR transgéniques est leur faible affinité qui découle du processus de sélection thymique [6].

L’alternative aux TCR Tg est représentée par les CAR-T cells. Il s’agit de lymphocytes T transduits avec un récepteur chimérique à l’antigène, correspondant à une protéine chimère composée de la partie variable d’une immunoglobuline reconnaissant un antigène associée à des domaines de signalisation du signal d’activation du lymphocyte T. Le CAR a l’avantage, par rapport au TCR Tg, d’être doté d’une reconnaissance directe de l’antigène sans que celui-ci

ne soit apprêté par une molécule HLA et permet de sélectionner des antigènes de bonne affinité avec une meilleure maîtrise des risques de reconnaissance croisée. A contrario, la reconnaissance de la cible antigénique par les CAR-T cells implique que les cibles soient exprimées à la surface des cellules tumorales.

### Structure et évolution des CAR

L'activation d'un lymphocyte T est un phénomène complexe qui requiert plusieurs signaux (Figure 1A). Le signal 1 est médié par la reconnaissance du TCR (chaîne  $\alpha$  et  $\beta$ ) d'un antigène présenté par une molécule HLA à la surface d'une cellule présentatrice d'antigène (CPA) pouvant être une cellule tumorale ou infectée. Le TCR est associé aux molécules CD3/CD4 ou CD8 et transduit son signal via la molécule CD3. Ce premier signal est indispensable à l'activation lymphocytaire mais en l'absence de signal supplémentaire, le lymphocyte T deviendra anergique.

Le signal 2 est un signal de co-stimulation médié par l'interaction entre les molécules telles que CD28, OX40, CD137 (4-1BB), CD27, CD30 ou ICOS exprimées par le lymphocyte T activé et leurs ligands respectifs exprimés sur la CPA au sein de la synapse immunologique. Ces deux premiers signaux vont activer de nombreuses voies de signalisation intracellulaire et permettre la translocation de facteurs nucléaires tels que NFkB, NFAT, AP1. Ces facteurs vont conduire à la transcription de gènes d'activation du cycle cellulaire T et à la production de cytokines (comme IL-2). L'expression membranaire des récepteurs de cytokines (CD25 = récepteur de IL-2) est également régulée à la hausse par ces facteurs nucléaires. Un troisième signal, dit signal cytokinique (signal 3) est nécessaire pour induire d'une part le cycle cellulaire et la prolifération lymphocytaire (principalement médié par IL-2) et, d'autre part la polarisation du lymphocyte T (réponse Th1, Th2, Th9, Th17 ou T régulatrice) régulée par les cytokines produites par la CPA (telle qu'IL-12 pour la polarisation Th1).

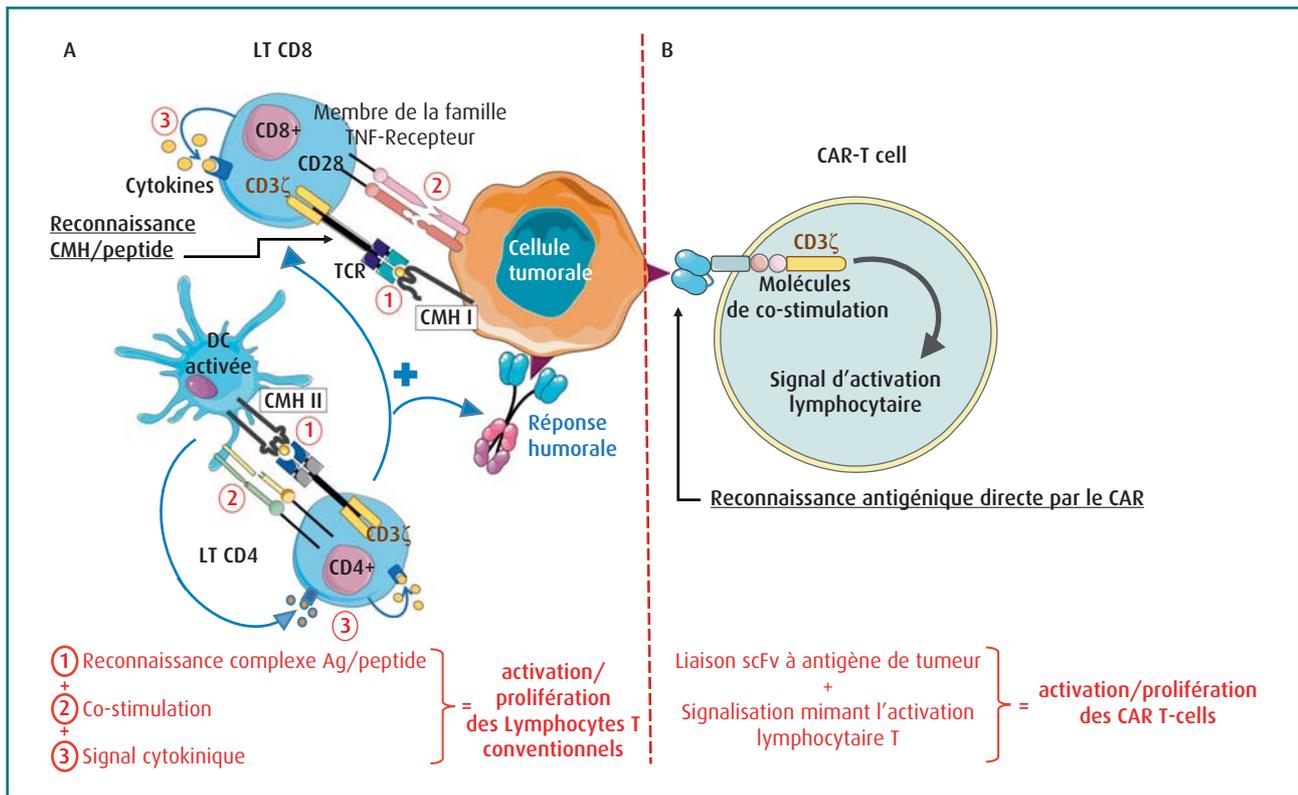


FIGURE 1 Mode d'activation des lymphocytes T conventionnels et des CAR-T cells.

A. Dans le cadre de la réponse immunitaire adaptative médiée par les LT, l'activation et la prolifération lymphocytaire ne peut être assurée que par l'association de 3 signaux. D'abord la reconnaissance du complexe antigène/CMH par le TCR (signal 1), puis l'interaction des molécules de co-stimulation (signal 2) et la réception de signaux cytokiniques (signal 3).

B. Le récepteur chimérique des cellules CAR-T porte quant à lui l'ensemble des signaux d'activation, via le domaine de signalisation CD3 et l'expression des molécules de co-stimulation. Ces signaux sont déclenchés dès la reconnaissance directe de la cible antigénique par le fragment variable (scFv) de l'immunoglobuline reconnaissant spécifiquement l'antigène cible. Les signaux de co-stimulation induisent l'activation du lymphocyte CAR-T après reconnaissance de l'antigène conduisant à la production de cytokines et l'expression de récepteurs de cytokines tel que CD25 sur le CAR-T activé, mimant le signal 3 cytokinique d'activation lymphocytaire T conventionnelle et permettant la prolifération des CAR-T cells. L'activation des CAR-T cells est par ailleurs potentiellement amplifiée par la libération de cytokines inflammatoires liée à la lyse tumorale et l'activation des CPA et des monocytes/macrophages (syndrome de relargage cytokinique).

Les CAR-T cells ont été élaborés de manière à mimer l'activation du lymphocyte T après reconnaissance spécifique d'un antigène tumoral, non pas par son TCR, mais par la partie variable d'immunoglobuline synthétique. Il fallait ensuite pouvoir reproduire les signaux d'activation lymphocytaire sans utiliser le recours initial « classique » du TCR (Figure 1B). Dans ces objectifs, différentes générations de CAR ont été développées (Figure 2).

Les CAR de 1<sup>re</sup> génération étaient composés d'une région variable (scFv) d'immunoglobuline d'origine murine reconnaissant l'antigène cible, d'un domaine transmembranaire et du domaine intracellulaire de signalisation de la molécule CD3ζ (partie de la molécule CD3 qui transmet le signal TCR-CD3). L'expérimentation in vivo de ces CAR-T cells de 1<sup>re</sup> génération dans les modèles animaux a cependant démontré que le niveau d'activation et d'expansion était insuffisant pour produire une réponse immune durable et efficace [7].

Une seconde génération de CAR a été rapidement développée pour optimiser l'activation, la survie et la fonctionnalité in vivo des CAR-T cells [8]. L'innovation de cette seconde génération a été d'ajouter à la chaîne CD3ζ un domaine de co-stimulation, le plus souvent CD28 ou 4-1BB. La majorité des études publiées à ce jour ont utilisé des CAR de 2<sup>e</sup> génération. Les profils cytotoxiques et métaboliques des CAR-T cells diffèrent selon les constructions. Par exemple, la conformation de la zone charnière entre le domaine scFv et le domaine transmembranaire peut influencer l'activité de la cellule CAR-T [9], et les CAR de 2<sup>e</sup> génération avec 4-1BB semblent montrer une moindre activité cytotoxique mais

une meilleure longévité par rapport aux CAR-T cells portant le domaine CD28 [10].

Les CAR de troisième génération incluent une ou plusieurs molécules de co-stimulation supplémentaires par rapport aux « 2<sup>e</sup> génération ». Ces molécules sont issues de la famille des TNF-récepteurs, le plus souvent 4-1BB ou/et OX40 [11]. La présence de plusieurs signaux de co-stimulation permet d'éviter l'anergie cellulaire et de limiter l'apoptose après la reconnaissance antigénique. Ces nouveaux CAR ont ouvert la voie à la génération de cellules T spécifiques de l'antigène capables de sécrétion auto-crine d'IL-2 et une plus importante capacité d'expansion après une exposition répétée à l'antigène [12]. À ce jour cependant, il n'a pas été montré que ces CAR de 3<sup>e</sup> génération permettent d'obtenir de meilleurs résultats que les CAR de 2<sup>e</sup> génération.

Récemment, une 4<sup>e</sup> génération de CAR a été construite dans laquelle l'expression de co-récepteurs, de cytokines solubles ou d'autres ligands de co-stimulation est induite par l'activation du CAR. Le cas des TRUCKs (*T cells Redirected Universal Cytokine product*) ou CAR armés est particulièrement intéressant. Dans ces cellules, le transgène juxtapose un promoteur inducible (comportant les motifs de liaison pour NFAT) avec la séquence codante d'une cytokine [13]. L'exemple le plus abouti à ce jour est celui des TRUCKs sécrétant l'IL-12. Cette cytokine favorise l'activation et la différenciation des lymphocytes Th1 anti-tumoraux, protège les CAR-T cells du micro-environnement tumoral inhibiteur et recrute des cellules immunitaires qui accompagnent l'activité anti-tumorale des CAR-T cells (réduction des T régulateurs, activation de cellules

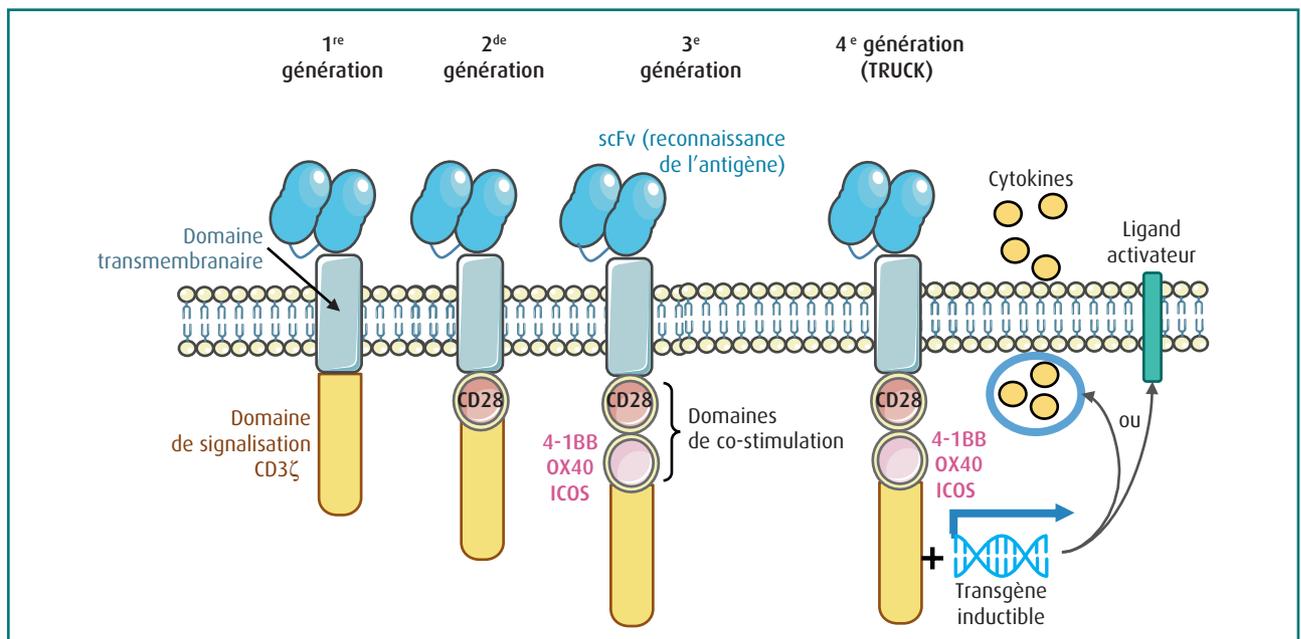


FIGURE 2  
**Les différentes générations de CAR.**

Les CAR-T cells de 1<sup>re</sup> génération consistent en une partie du fragment variable d'immunoglobuline (scFv) fusionné à un domaine d'activation CD3ζ. Dans la 2<sup>e</sup> génération, un domaine de co-stimulation intracellulaire supplémentaire apparaît, habituellement CD28 ou 4-1BB (CD137). Les CAR-T de 3<sup>e</sup> génération combinent deux ou plusieurs domaines de co-stimulation. Les CAR de 4<sup>e</sup> génération sont construits avec un élément inducible par activation pour permettre, par exemple, la sécrétion d'un produit transgénique tel que des cytokines ou bien un ligand activateur.

NK et macrophages) [14]. L'avantage de l'utilisation de ce type de construction est que l'IL-12 est produite aussi longtemps que le lymphocyte génétiquement modifié reconnaît et engage la cible.

## Sélection de la cible du CAR

Le choix de la cible est essentiel pour obtenir la meilleure efficacité avec une toxicité acceptable. Idéalement, la cible doit être exprimée de façon uniforme, importante et sélective sur les cellules tumorales. Ce critère n'est pas l'unique déterminant de l'efficacité des CAR-T cells, l'hétérogénéité d'expression antigénique sur les différents clones tumoraux de certaines tumeurs et la sélection clonale peuvent concourir à l'échappement aux CAR-T cells. Inversement, le choix de la cible va conditionner la toxicité des CAR-T cells par l'induction d'un effet « *on-target/off-tumor* » qui est lié à la destruction de tissus sains par les CAR-T cells en cas d'expression partagée de la cible antigénique en dehors du tissu tumoral. De nombreux antigènes cibles ont été sélectionnés dans les hémopathies malignes et les tumeurs solides [15], les cibles les plus étudiées à ce jour sont répertoriées dans le *Tableau 1*. En onco-hématologie, le succès des CAR-T cells dirigées contre le CD19 dans les hémopathies lymphoïdes B est lié à l'expression habituelle de cette cible par les clones B tumoraux alors que le CD19 n'est pas exprimé à la surface des cellules souches hématopoïétiques. Il est cependant exprimé par les lymphocytes B non tumoraux et la persistance des CAR-T cells est associée à une aplasie B et une hypogammaglobulinémie profonde. D'autres cibles sont en cours de développement dans les hémopathies lymphoïdes matures : CD20, CD22, CD23 pour les lymphomes/leucémie lymphoïde chronique (qui auront les mêmes conséquences que la cible CD19 sur la lymphopoïèse B). Le CD30 est une cible connue pour certains lymphomes T et dans la maladie de Hodgkin : 6 essais cliniques (phase I-II) avec des CAR ciblant CD30 pour ces hémopathies sont actuellement ouverts dans le monde (Chine et États-Unis). Parmi les cibles potentielles dans le myélome, BCMA et SLAM-7 sont celles qui retiennent le plus l'attention [16]. SLAM-7 n'est pas exprimé sur les cellules non-hématopoïétiques (contrairement à d'autres candidats comme CD38 ou CD138) et son expression reste stable quel que soit le statut de la maladie. BCMA est un membre de la famille TNF, exprimé uniformément sur les plasmocytes tumoraux. Plusieurs essais cliniques injectant des CAR-T cells anti-BCMA ont suggéré son efficacité remarquable dans des myélomes multi-traités avec une toxicité acceptable [16]. Dans les hémopathies myéloïdes, il est très difficile de trouver des cibles exprimées par les cellules leucémiques épargnant les cellules souches hématopoïétiques. La plupart des cibles telles que CD123, CD33, FLT3, en cours de développement dans les essais cliniques, ciblent la cellule souche et vont induire une aplasie médullaire prolongée. Avec des CAR-T conventionnels, ces stratégies doivent être envisagées comme des approches permettant d'obtenir une rémission avant une allogreffe de CSH (concept de « *bridge* » à la greffe).

La société Belge Celyad développe des CAR-T cells exprimant NKG2D à la place de la partie variable d'immunoglobuline. Le récepteur NKG2D, habituellement exprimé par les cellules NK, a

TABLEAU 1  
Antigènes cibles des CAR.

Tumeur	Cibles antigéniques des CAR
<b>Hémopathies malignes</b>	
LAL B	CD19, CD20, CD22, CD23
LNH B, LLC	CD19, CD20, CD22, CD23
Hodgkin	CD30
Myélome	BCMA, SLAM7, CD138, CD38, MAGE, NKG2D
LAM/MDS	CD123, CD33, FLT3, WT1, NKG2D
Hémopathies T	CD5, CD7
<b>Tumeurs solides</b>	
Glioblastome	EGFRn EGFRIII, HER2, IL13Rα2
Pancréas	MSLN, Muc1, NKG2D
Prostate	PSMA
Sein	HER2, MSLN, HER2+Muc1, NKG2D, cMet
Ovaire	A-folate receptor, FAP, Muc16, NKG2D
Estomac	HER2, CEA, EGFR
Foie	Muc1, GPC3
Colon métastatique	HER2, NKG2D
Rein métastatique	Carbonic anhydrase IX
Mésothéliome pleural	FAP, MSLN
Sarcome HER2+, osteosarcome	HER2, GD2
Neuroblastome	GD2, CD171
Médulloblastome	HER2+CD19
Métastases hépatiques	CEA
Mélanome	MART-1, MAGE, VEGFR+gp100+TRP-1 or TRP2

*BCMA : B-cell Maturation Antigen, CEA : carcinoembryonic antigen, cMet : tyrosine-protein kinase Met (= HGFR : hepatocyte growth factor receptor), EGFR : epidermal growth factor receptor, FAP : fibroblast activation protein alpha, FLT3 : fms related tyrosine kinase 3, GD2 : Ganglioside G2, GPC3 : Glypican-3, HER2 : human epidermal growth factor receptor 2 (= ErbB2), IL13R : IL-13 receptor, MAGE : Melanoma Antigen Gene, MART-1 : melanoma antigen recognized by T cells 1, Muc : mucine, MSLN : mesothelin, PSA : prostate specific antigen, TRP : Tyrosinase related protein, VEGF : Vascular endothelial growth factor.*

pour ligands les molécules de stress MICA/MICB exprimées par de nombreuses cellules tumorales. Les essais avec ces CAR-T NKG2D sont en cours dans diverses hémopathies malignes et tumeurs solides.

Dans le domaine des tumeurs solides, les premières expériences concluantes issues du développement clinique des CAR-T ciblaient HER2. Dans une première étude menée avec un CAR de troisième génération comprenant des modules de signalisation pour CD3, CD28 et 41BB et doté d'une forte affinité, une toxicité limitante pulmonaire a imposé l'arrêt du développement [17]. L'utilisation

d'un CAR de moindre affinité pour HER2 et de seconde génération (modules de signalisation pour CD3 et CD28) a en revanche permis le traitement de patients porteurs de cancers solides exprimant HER2 avec une bonne tolérance et constatation d'une efficacité clinique [18]. Nous noterons une certaine efficacité rapportée des CAR-T cells, ciblant le variant III du récepteur à l'EGF (EGFRvIII) ou HER2, sur de petites séries de patients atteints de glioblastome, suggérant la capacité d'accès des lymphocytes T génétiquement modifiés au système nerveux central. En parallèle, des essais avec injection de CAR-T cells anti-IL-13R en intra-tumoral ont été rapportés avec des résultats prometteurs [19].

La sélection de la cible du CAR est fondamentale pour l'obtention d'une efficacité optimale et limiter les effets de cytotoxicité vis-à-vis de cellules saines exprimant l'antigène d'intérêt (effet dit « on target/off tumor »). Ainsi la meilleure façon d'éviter les manifestations de toxicité sur les cellules saines sans compromettre l'efficacité du CAR, est de cibler un antigène exclusivement exprimé par les cellules tumorales. Le seul CAR ciblant un antigène réellement spécifique des cellules tumorales est le CAR ciblant EGFRvIII retrouvé sur les cellules tumorales de glioblastome. Les antigènes avec des glycosylations aberrantes exprimées uniquement par les cellules malignes (comme Mucine 1 dans le cancer de l'ovaire), représentent une alternative en cours d'investigation.

## Biotechnologie : modes de production et sources cellulaires

### Méthodes de transduction du CAR dans les lymphocytes

L'introduction du matériel génétique codant pour le CAR dans la cellule lymphocytaire est rendue possible grâce à des techniques utilisant des systèmes viraux ou non (Figure 3).

### Stratégies virales

La thérapie génique virale utilise la capacité naturelle de certains virus (gammaretrovirus, lentivirus, adénovirus et adénovirus associés (AAV)) de s'introduire dans les cellules et d'y intégrer du matériel génétique, mécanisme dénommé transduction. Les gammaretrovirus et les lentivirus sont des sous-types de rétrovirus possédant un génome à base d'ARN qui est converti en ADN dans les cellules transduites par une rétrotranscriptase d'origine virale. Ainsi, les vecteurs viraux encapsulés dans des particules peuvent s'intégrer dans le génome de la cellule hôte et conduire à une expression permanente du transgène ; ces virus sont qualifiés de virus intégratifs. La différence majeure entre les deux sous-types réside dans l'état d'activation des cellules lors de la transduction. Les rétrovirus ne peuvent infecter que les cellules en cours de division cellulaire alors que celle-ci n'est pas nécessaire pour l'infection par

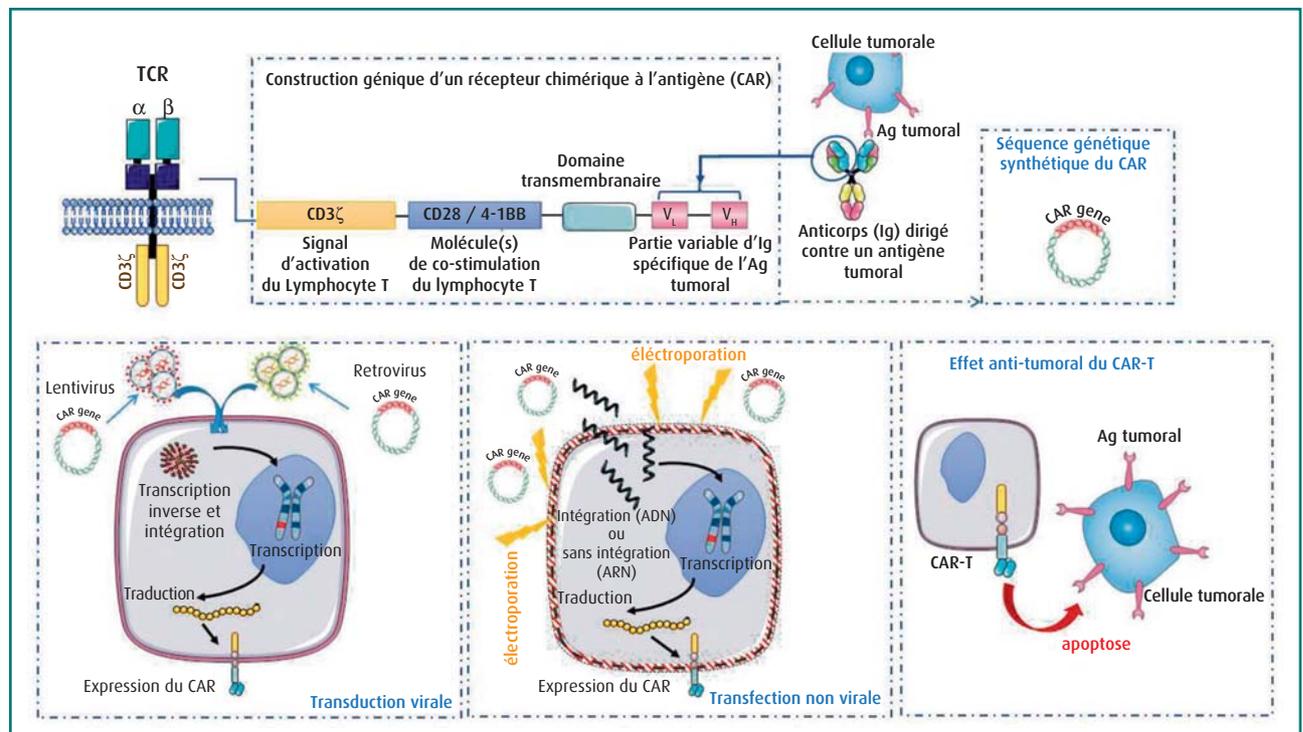


FIGURE 3  
Production des CAR-T cells.

La production de CAR-T cells débute par la synthèse par génie génétique de la construction choisie (incluant les séquences géniques codant pour la partie svFv de l'immunoglobuline spécifique de l'antigène cible + domaine charnière + domaines de co-stimulation + CD3ζ). La séquence génétique est ensuite insérée dans les lymphocytes T, soit par une transduction virale, soit par transfection mécanique de type électroporation. La production de vecteurs viraux nécessite la génération de banques de lignées cellulaires d'empaquetage qui produisent des particules rétrovirales contenant le transgène. Le surnaageant rétroviral qualifié est ensuite utilisé pour transduire les lymphocytes T.

les lentivirus. Bien que l'utilisation des gammaretrovirus soit très répandue en recherche, le nombre d'essais cliniques utilisant les vecteurs lentiviraux ne cesse d'augmenter pour des raisons de sécurité. En effet, 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 mutation d'oncogènes par mutagenèse insertionnelle [20], mais il n'a cependant pas été observé à ce jour avec les CAR-T cells contrairement aux approches de manipulations génétiques des cellules souches hématopoïétiques. Toutefois, une surveillance à plus long terme permettra de statuer sur cet éventuel risque en cas de transduction de cellules matures. Des vecteurs viraux non-intégratifs (*non-integrating lentiviral vector* (NILV) et adénovirus) sont en cours d'étude afin de limiter encore ce risque [21].

Les CAR-T cells qui ont obtenu l'autorisation de mise sur le marché par la Food and Drug Administration en 2017 sont générés à partir d'un rétrovirus pour le premier (Kymriah®, Novartis) et un lentivirus pour le deuxième CAR T cells CD19 autorisés (Yescarta®, Gilead/Kite).

### Stratégies non-virales

Les interrogations quant à la sécurité de ces stratégies avec vecteurs viraux ont conduit au développement de systèmes alternatifs d'introduction de séquences géniques dans la cellule et dans son génome.

Les différents systèmes non viraux d'introduction de gènes dans la cellule incluent des systèmes physiques (comme l'électroporation) ou chimiques (comme les nanoparticules) [22].

L'électroporation est la technique non virale la plus utilisée actuellement. Elle consiste à appliquer un courant électrique sur les cellules afin d'augmenter la perméabilité cellulaire. Cette technique de transgénèse est plus rapide, théoriquement plus sûre et plus économique que les stratégies virales avec toutefois une viabilité cellulaire altérée. Des vecteurs non-viraux permettant l'intégration de l'ADN du gène codant pour le CAR par électroporation dans le génome des lymphocytes T sont en cours d'étude tels que les systèmes des transposon/transposase (*Sleeping Beauty*) et *piggyBac* [23]. Il est possible de réaliser une transfection d'ARN messager codant pour le CAR via électroporation ou endocytose. Dans ce cas, l'expression est transitoire, d'environ une semaine. Cette approche pourrait être intéressante pour limiter la toxicité on target/off tumor de certaines CAR-T cells et a déjà été utilisée dans le traitement de tumeurs solides [24]. Les nanoparticules combinent : 1) une enveloppe recouverte de fragments Fab d'anticorps reconnaissant le co-récepteur CD3e des lymphocytes T afin de les cibler et pouvoir les transfecter, 2) un système de délivrance nucléaire efficace du gène à transcrire et 3) une intégration chromosomique de la séquence CAR stable grâce à un système *piggyBac*. Ces nanoparticules peuvent reprogrammer les lymphocytes T in vivo pour leur faire exprimer un CAR [25]. Le recours aux nanotechnologies est prometteur par son efficacité et son potentiel de réduction des coûts de production. Toutefois la sécurité de cette approche doit encore être évaluée chez l'homme.

### Sources cellulaires utilisées pour générer des cellules exprimant un CAR

#### Sous types de lymphocytes T

Après activation par un antigène, un lymphocyte T naif ( $T_N$ ) se différencie en lymphocytes T souche central mémoire ( $T_{SCM}$ ), puis T central mémoire ( $T_{CM}$ ), T effecteur mémoire ( $T_{EM}$ ) et T effecteur terminal ( $T_{EMRA}$ ). Le degré de différenciation d'un lymphocyte T a un impact sur sa fonction et sa capacité de prolifération. Les  $T_N$ ,  $T_{SCM}$  et  $T_{CM}$  ont une importante capacité proliférative tandis que les  $T_{EM}$  et  $T_{EMRA}$  ont une durée de vie limitée bien que leur fonction cytotoxique soit augmentée [26]. Ainsi, les CAR-T cells issues de lymphocytes  $T_{SCM}$  et  $T_{CM}$  ont une longévité plus importante permettant une meilleure efficacité des protocoles de transfert cellulaire adoptif. Ces notions d'immunologie fonctionnelle soulèvent des questions concernant d'une part la meilleure cible lymphocytaire T à transcrire, et d'autre part du ratio de lymphocytes T CD4 et CD8 à respecter pour obtenir des résultats d'efficacité optimaux. Il est par exemple possible de sélectionner des sous populations de lymphocytes T avant transduction, ou de favoriser la génération de  $T_{SCM}$  et  $T_{CM}$  en culture selon le cocktail cytokinique utilisé et d'ajuster le ratio CD4/CD8 dans le produit final [27]. Ces données de qualité des cellules administrées devraient être systématiquement monitorées dans les études cliniques et corrélées aux résultats cliniques.

#### CAR-T allogéniques

Un des obstacles au développement clinique de la thérapie cellulaire et génique en condition autologue repose sur la difficulté de récolter un nombre suffisant de lymphocytes T autologues intacts à partir de patients lymphopéniques. La production de plusieurs doses de CAR-T cells émanant d'un seul donneur allogénique sain permettrait aussi de réduire les coûts de production. Il est cependant nécessaire dans un contexte de lymphocytes T allogéniques d'invalider l'expression du TCR endogène de ces cellules pour éviter qu'il puisse développer une réponse allogénique de type GVH. Par ailleurs, l'invalidation de son CMH est également en théorie requise pour limiter son immunogénicité et son rejet. Il existe de nombreuses stratégies capables d'induire l'annulation de l'expression du TCR et/ou du CMH dont les plus étudiées sont le système TALEN (*Transcription Activator like effector nucleases*) et le CRISPR/Cas9 (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeat*). Le système TALEN permet de couper précisément certaines régions de l'ADN [28]. Plus récemment développé, le système CRISPR/Cas9 est un autre ciseau moléculaire comprenant un petit ARN guide (gRNA) capable de reconnaître une séquence d'ADN cible et une nucléase Cas9 qui clive spécifiquement cet ADN reconnu. Les manipulations génétiques multiples des cellules posent toutefois la question du risque théorique de mutagenèse insertionnelle accrue bien qu'à ce jour aucun cas de génotoxicité n'ait été rapporté avec des vecteurs lentiviraux.

La société française Collectis est la première à développer ce type de CAR-T allogéniques. L'équipe a développé un premier UCART-19 (anti-CD19) utilisant le système TALEN pour annuler le TCR et CD52 à la surface des CAR-T cells (les rendant insensibles à l'alemtuzumab utilisé dans le régime lymphodéplétant avant administration des CAR-T cells). Les résultats de l'étude de phase I sont encourageants dans la LAL réfractaire chez l'enfant (5 réponses moléculaires à J28 sur 7 patients traités, 1 GVH de grade I) [28]. Ce produit est en cours d'étude avec SERVIER dans les LAL en rechute ou réfractaires en Europe et aux États-Unis. Par ailleurs, leur UCAR-123 (anti-CD123) a obtenu l'autorisation d'essai clinique dans le traitement de la LAM et de la leucémie à cellules dendritique plasmacytoïdes (LpDC). La question de la persistance de ces CAR-T allogéniques se pose ainsi que le conditionnement qui permet une expansion et survie optimale de ces CAR-T allogéniques.

### CAR NK

Les cellules NK sont des lymphocytes spécialisés dans la lyse cellulaire. Elles jouent un rôle important dans la réponse immunitaire innée, non dépendante d'antigènes, contre les cellules infectées et tumorales. Elles ont l'avantage de ne pas produire de cytokines en quantité importante après activation, ce qui limiterait le risque de syndrome de relargage cytokinique. Leur potentiel cytolytique est finement contrôlé par la balance entre des signaux inhibiteurs (transmis par les récepteurs reconnaissant des molécules HLA de classe I autologues dont l'expression peut être altérée sur les cellules tumorales) et des signaux activateurs (transmis notamment par NKG2D reconnaissant les molécules de stress MICA/MICB surexprimées sur de nombreuses cellules tumorales). Différents type de CAR NK ont été développés : des CAR conventionnels ciblant les antigènes tels que CD19, CD20, CD33, CD244, HER2 et Muc1 ou des CAR associant NKG2D/CD3 $\zeta$ /DAP10 [29]. Cette dernière construction a montré son efficacité à lyser diverses cellules tumorales sans effet « *off tumor* ». Les études cliniques sont en cours en Chine et aux États-Unis.

## Méthodes d'optimisation des CAR-T cells : « Smart T cells »

Pour augmenter la sécurité des thérapies à base de CAR-T cells, différentes améliorations ont été apportées afin d'augmenter la sélectivité et contrôler l'activation des lymphocytes T. Ces smart T cells sont en cours d'investigation pré-clinique et clinique (Figure 4).

### Augmentation de la sélectivité

Une manière d'augmenter la sélectivité du CAR est de combiner la reconnaissance de plusieurs antigènes, le plus souvent deux. Une des approches est la co-expression de deux CAR reconnaissant 2 antigènes différents par les lymphocytes T. Les dual CAR conditionnels sont constitués d'un CAR qui transmet le signal d'activation (CD3 $\zeta$ ) et d'un autre CAR qui transmet le signal de

co-stimulation (CD28) (Dual-CAR conditionnels). L'activation des lymphocytes T est conditionnée par la reconnaissance des deux antigènes simultanément comme par exemple HER-2 et MUC-1 dans le cancer du sein [30]. Deux CAR entiers peuvent également être exprimés par le même lymphocyte T (Dual CAR ou Multi-CAR) [31]. Une approche similaire consiste en l'utilisation d'un CAR avec deux domaines de reconnaissance reliés en tandem (CAR en Tandem). De la même façon, le système des récepteurs *synthetic Notch* (synNotch) permet d'obtenir un contrôle spatial de l'activation des lymphocytes T grâce à la reconnaissance combinée de deux antigènes. Les récepteurs SynNotch sont constitués d'un domaine extracellulaire de reconnaissance d'un antigène (scFv) et d'un domaine intracellulaire d'activation transcriptionnelle. La reconnaissance antigénique conduit au clivage du récepteur synNotch et à la libération du facteur de transcription qui entraîne l'expression du gène codant pour le CAR. La liaison du CAR à l'antigène cible augmente la prolifération et les capacités cytotoxiques des lymphocytes T (CD19 synNotch/MSLN CAR) [32]. Ces trois approches permettent de cibler de manière plus spécifique la cible tumorale car les lymphocytes T doivent reconnaître deux antigènes sur la même cellule cible pour s'activer. Par ailleurs, ils pourraient limiter l'échappement de la tumeur suite à la perte de l'expression d'une cible unique. Ce concept a déjà été évalué dans une étude clinique utilisant des « dual CAR » pour CD19 et CD123 [31].

Les CAR inhibiteurs (iCAR) utilisent le double ciblage antigénique pour inhiber l'activation d'un CAR actif grâce à l'engagement d'un second récepteur CAR suppresseur équipé de domaines de signalisation inhibiteurs, généralement PD-1 ou CTLA-4. L'avantage est que ces *iCAR-T cells* entraînent la lyse des cellules cancéreuses qui expriment l'antigène cible du CAR tout en épargnant les cellules saines exprimant, en plus, l'antigène cible du iCAR.

### Contrôle de l'activation

Afin de réduire la toxicité des CAR-T cells, il est possible de contrôler la durée de l'expression ou d'éliminer spécifiquement les cellules génétiquement modifiées après l'administration. La stratégie des « *split CAR* » consiste à utiliser un système permettant l'activation du CAR uniquement en présence d'agents associant le domaine de reconnaissance de l'antigène au domaine de signalisation intracellulaire [33].

À l'inverse, un système de *switch* peut également être utilisé pour inhiber les CAR-T cells de manière irréversible. Ce sont les systèmes de gènes suicides. L'approche la plus ancienne consiste à incorporer la kinase du virus de type herpes simplex (système HSV-TK) dans le vecteur d'expression génique ce qui confère aux LT une sensibilité au ganciclovir (habituellement utilisé comme antiviral), et permet leur élimination en 24-48 heures après administration de ganciclovir [34]. Le système d'inhibition le plus couramment utilisé aujourd'hui est le recours à l'expression d'une caspase inductible en quelques heures dans les cellules génétiquement modifiées [35]. Cette caspase est induite par l'administration d'un agent dimérisant, l'AP1903. Cette déplétion sélective peut également être induite par des anticorps lorsque

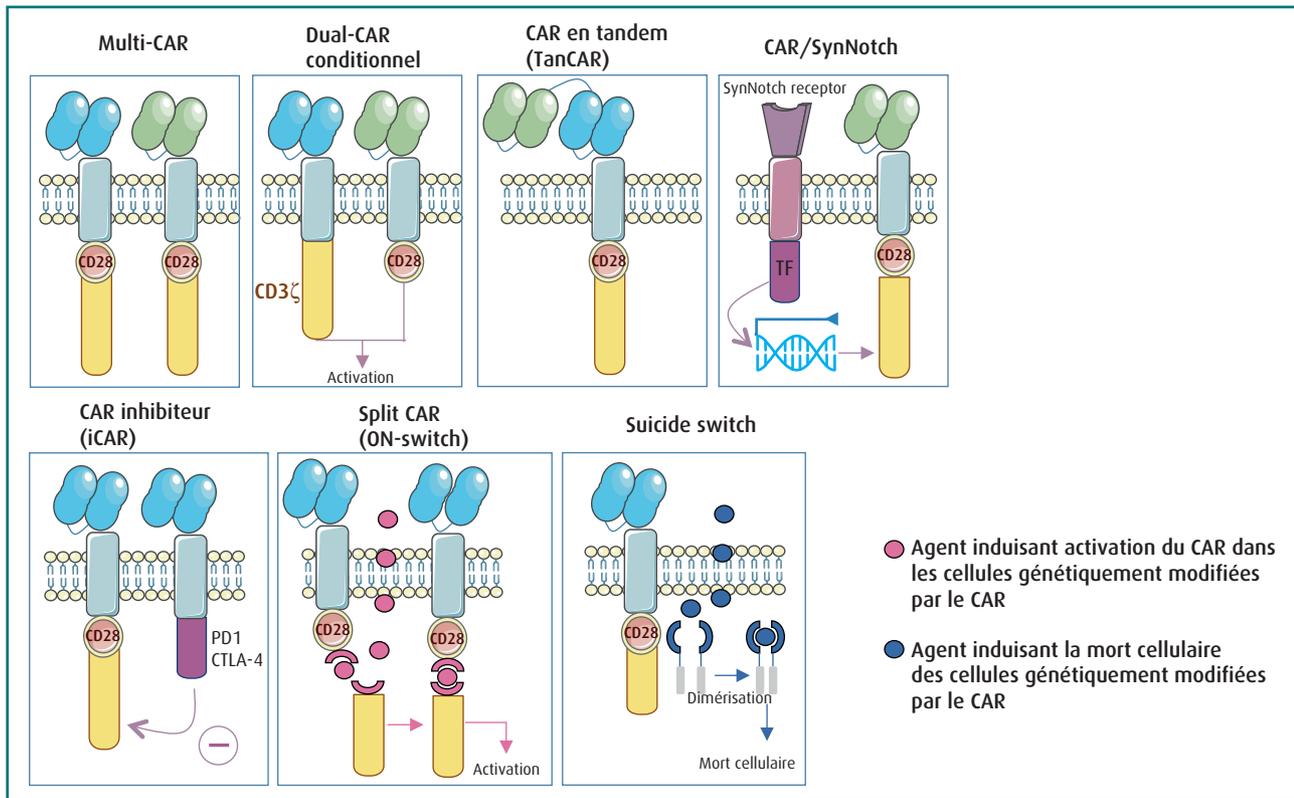


FIGURE 4  
Smart T cells.

Les Dual CAR ou Multi-CAR T cells expriment plusieurs CAR avec des spécificités antigéniques différentes permettant d'éviter l'échappement tumoral dû à la perte de l'expression d'un antigène cible. Les Dual CAR T cells conditionnels expriment deux CAR de spécificité antigénique différente dont l'un porte le signal d'activation et l'autre le signal de co-stimulation, seule la reconnaissance des deux CAR simultanément permet l'activation des Dual CAR T cells et limite leur toxicité. Les CAR T cells en tandem présentent un CAR constitué de deux domaines de reconnaissance de l'antigène (scFv) avec des spécificités antigéniques différentes reliés en tandem. Pour les CAR conditionnels SynNotch, la reconnaissance d'un antigène par le récepteur synNotch entraîne la libération d'un facteur de transcription (TF) qui active la transcription du gène codant pour le CAR. Cette stratégie permet de contrôler l'expression du CAR en fonction de la reconnaissance d'un autre antigène. Les CAR inhibiteurs (iCAR) sont munis d'un domaine intracellulaire inhibiteur permettant de réguler l'activation d'un autre CAR activateur suite à la reconnaissance d'un antigène exprimé exclusivement sur les cellules saines. Dans le modèle de Split CAR ou ON-switch, le domaine de reconnaissance est séparé du domaine de signalisation. Une molécule est nécessaire afin d'assembler le CAR et permettre l'activation des CAR-T cells suite à la reconnaissance de l'antigène. À l'inverse les CAR T cells équipés de gènes suicides (*Suicide switch*) peuvent être éliminés de manière sélective suite à l'intervention de molécules permettant d'activer des voies de mort cellulaire, par exemple, la voie de l'apoptose suite à la dimérisation de la Caspase 9 inducible, iCasp9 induite par l'AP1903.

les CAR-T cells sont génétiquement modifiées pour exprimer la cible de l'anticorps comme par exemple l'EGFR tronqué (TEGFR) reconnu par le cetuximab pour JCAR017 en cours de développement par Celgene) [36] ou le rituximab qui cible la molécule CD20 dans les CAR anti-CD19 (UCART-19) de Collectis/Servier.

### Conséquences immunologiques observées après administration des CAR-T cells dans les hémopathies malignes et perspectives d'optimisation

Le plus grand succès à ce jour des traitements utilisant des CAR-T cells a été obtenu dans les hémopathies lymphoïdes B aiguës (LAL) ou matures (Lymphomes/LLC) exprimant CD19. Les taux de réponse chez des patients en rechute et/ou réfractaires aux

traitements conventionnels, incluant l'allogreffe de CSH, varie de 50 à plus de 80 %.

Ces études ont confirmé la capacité des CAR-T cells, dont la grande majorité étaient de seconde génération, à s'activer, proliférer (comme en témoigne leur détection dans le sang périphérique) et produire des quantités importantes de cytokines inflammatoires (en particulier IL-6, TNF-α et IFN-γ) in vivo. Ces effets associés à un syndrome de lyse tumorale potentiellement massif et rapide expliquent les effets secondaires avec un syndrome de relargage cytokinique (CRS) pouvant mettre en jeu le pronostic vital par choc cytokinique et nécessitant dans les formes sévères un traitement par anti-R-IL-6 (tocilizumab). Dans ce contexte pro-inflammatoire majeur, des syndromes d'activation macrophagiques ont été observés et une neurotoxicité, dont la physiopathologie reste

mal comprise et semblerait liée à une toxicité endothéliale des CAR-T cells et/ou des cytokines [37].

L'effet « *on target/off tumor* » responsable d'une aplasie lymphocytaire B associée à une hypogammaglobulinémie est constamment observé chez les patients tant que les CAR-T cells ciblant CD19 persistent. La durée de vie des CAR-T cells est variable d'une étude à l'autre et pourrait au moins en partie dépendre du type de construction (persistance plus prolongée avec les CAR 4-1BB) et de la méthode de transduction.

En termes de réponse, si les taux de rémission sont très élevés dans les LAL-B, ceux observés dans les lymphomes et la LLC sont d'environ 40 à 50 %. Cela pose la question de l'accessibilité des CAR-T cells dans les sites intramédullaires mais également de leur durée de vie *in vivo*, de leur niveau d'épuisement et/ou sénescence. En effet, la CAR-T cell, tout comme tout lymphocyte T fortement activé, va exprimer PD1 et perdre son activité face à une cellule tumorale exprimant PDL1. Des stratégies de combinaison des CAR-T avec des inhibiteurs de PD1/PDL1 sont en cours, ainsi que des CAR-T cells avec le gène codant PD1 qui a été invalidé. Par ailleurs, des études du microenvironnement tumoral corrélées à la réponse seraient utiles pour déterminer des facteurs de risque d'échappement à l'immunothérapie et développer des stratégies pouvant contourner ces mécanismes [27,38].

Environ 50 % des patients répondeurs vont rechuter dans les LAL-B. La rechute est soit associée à la perte des CAR-T cells, notamment du fait de développement d'une réponse immunitaire dirigée contre la protéine chimérique ; soit liée à la perte d'expression de l'antigène cible. Ce phénomène d'immunosélection pourrait être réduit en utilisant des CAR-T cells ciblant plusieurs antigènes (CAR-T en tandem). Une perspective séduisante pour cibler plusieurs antigènes et limiter l'immunosélection repose sur les CAR dit « universels » ciblant non plus un antigène tumoral mais un marqueur tel que la biotine, le FITC ou encore le fragment constant d'un anticorps monoclonal. Dans ce modèle, ces marqueurs sont injectés aux patients pour fixer divers antigènes tumoraux et vectoriser les CAR-T cells universels injectés dans un second temps [39]. Les patients reçoivent avant l'administration des CAR-T cells une chimiothérapie lymphopénisante pour favoriser l'expansion des cellules injectées. Les CAR-T cells correspondent à un pool de lymphocytes polyclonaux dont la majorité est génétiquement modifiée, selon le taux de succès de la transduction. Les conséquences de cette approche sur la reconstitution immunitaire à court et à long terme ne sont pas connues. Si les études semblent ne pas montrer d'augmentation significative du nombre d'infections dans la phase d'aplasie initiale, un monitoring de la reconstitution immunitaire à long terme, au minimum des taux de CD4 et CD8, paraît justifié. Une surveillance du risque de second cancer est également préconisée.

## Spécificités dans les tumeurs solides

Un des premiers obstacles limitant l'efficacité des stratégies basées sur les CAR-T cells dans les cancers solides est leur capacité de homing et d'infiltration au sein des sites métastatiques.

Plusieurs stratégies biotechnologiques peuvent être utilisées pour favoriser l'infiltration des CAR-T cells dans les cancers. Certaines études précliniques montrent l'intérêt de moduler l'expression des récepteurs de chémokines par thérapie génique [40]. Dans ces expériences, l'expression de CCR2 conjointement au CAR favorise le recrutement en situation intra-tumorale des lymphocytes T dans des modèles de cancers exprimant fortement CCL2. Plus simplement, l'infiltration de CAR-T cells pourrait être améliorée par l'administration concomitante de chimiothérapies « immunogènes » induisant une signature transcriptionnelle de type interféron et la production des chémokines CXCL9 et CXCL10 (ligands de CXCR3 exprimé par les lymphocytes T CD8 et les lymphocytes T CD4 Th1) [41]. Adachi K *et al.* ont évalué dans un modèle préclinique la reprogrammation de CAR-T cells pour permettre la production par ces lymphocytes d'interleukine 7 (IL-7) et de CCL19. L'IL-7 et CCL19 sont impliquées physiologiquement dans l'homéostasie des zones riches en lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires. Le transfert de ces CAR-T cells ainsi reprogrammées permet le recrutement de cellules dendritiques à proximité de la tumeur et l'organisation de zones lymphoïdes tumorales, soutenant l'efficacité de cette stratégie thérapeutique [42]. Une autre alternative pour favoriser le recrutement et la survie des CAR T cells dans la tumeur est le traitement de métastases par des virus oncolytiques produisant des chémokines favorisant le homing des CAR-T cells et l'expression au sein des cancers de molécules immunomodulatrices (interleukines, peptidomimétiques) [43]. L'équipe de June *et al.* a élaboré un protocole permettant l'administration de TNF- $\alpha$  et d'IL-2 dans des modèles de cancers du pancréas [44]. Des stratégies basées sur la production par des adénovirus de CCL5 et d'IL-15 ont également été évaluées dans des modèles précliniques [43]. Dans ces modèles, CCL5 produit après infection par le virus oncolytique agit sur le recrutement de lymphocytes mémoires et l'IL-15 favorise la prolifération et la survie des CAR-T cells *in situ*. Les virus oncolytiques peuvent également être utilisés pour produire *in situ* des peptides antagonistes de voies de signalisation comme PD-L1 [45]. De nombreuses stratégies sont également en cours de développement pour maîtriser le microenvironnement immunosuppresseur des cancers solides.

Le stroma péri-tumoral constitue une véritable barrière physique limitant la capacité des CAR-T cells à infiltrer les cancers. L'intégration dans les CAR-T cells d'une capacité de production d'enzyme protéolytique capable de dégrader les constituants du stroma pourrait permettre une meilleure infiltration des cancers par les lymphocytes T. Par exemple, l'utilisation d'un transgène permettant la production d'héparanase s'est avérée efficace pour promouvoir l'infiltration intra-tumorale de CAR T cells dans un modèle préclinique de neuroblastome [46].

Plusieurs sous-types cellulaires interagissent pour entretenir les propriétés immunosuppressives du stroma tumoral. La présence de fibroblastes associés aux cancers (CAF) et de cellules myéloïdes suppressives est dans de nombreux cancers le principal obstacle à l'activation locale du système immunitaire. Des auteurs ont proposé de réaliser des CAR ciblant directement les CAF en utilisant des Fab ciblant FAP (*Fibroblast*

activation protein). L'activation des CAR-T cells au contact des CAF permet leur déplétion et la production d'interféron- $\gamma$  au sein de l'environnement tumoral en grande quantité. Cette inflammation localisée sélectivement dans la tumeur pourrait permettre la reprogrammation des cellules myéloïdes afin de limiter leurs fonctions immunosuppressives [47].

Une autre stratégie actuellement en développement est l'utilisation d'antagonistes pour prévenir le recrutement des cellules myéloïdes suppressives dans la tumeur. La neutralisation de CXCL12 ou de CSFR1 pourrait par exemple permettre la diminution du nombre de cellules myéloïdes dans la tumeur sans altérer le homing des CAR-T cells [48]. Une technologie applicable également pour optimiser l'efficacité des CAR-T cells et soustraire ces lymphocytes T à l'effet immunosuppresseur du TGF- $\beta$ 1, serait l'utilisation de récepteur dominant négatif de cette cytokine, capable de lier le TGF- $\beta$ 1 mais dépourvu de capacité de signalisation intracellulaire. Cette application a déjà démontré son efficacité dans des modèles précliniques de cancers de la prostate et est en cours d'évaluation chez l'homme en phase I [49]. Enfin, l'expression acquise de récepteurs inhibiteurs limitant la réactivation des CAR-T cells au sein de l'environnement tumoral pourrait être une limite de cette thérapie. Moon *et al.* ont comparé le phénotype de CAR-T cells isolés de la tumeur ou à distance (issus de splénocytes) après transfert adoptif [50]. Les CAR-T cells issus des lésions tumorales exprimaient fortement les récepteurs inhibiteurs PD-1, TIM-3, LAG-3 et CTLA4. La neutralisation de ces voies de signalisation permettait la réactivation des CAR-T cells issues des tumeurs. De nombreux essais cliniques combinent actuellement le transfert adoptif de CAR-T cells à l'administration d'anti-PD1/PDL1.

## Conclusion et perspectives

Le succès du transfert adoptif de CAR-T cells anti-CD19 dans les hémopathies malignes lymphoïdes B et les autorisations de mise sur le marché qui en ont découlé ont propulsé cette stratégie thérapeutique et révolutionné le domaine de l'immunothérapie anti-tumorale. Ces approches arrivent sur le marché après une trentaine d'années de recherche fondamentale sur le sujet grâce à la collaboration entre la recherche fondamentale académique, le développement des structures de biotechnologie et le transfert des brevets vers l'industrie pharmaceutique. Des améliorations biotechnologiques sont encore nécessaires afin notamment d'améliorer leur efficacité dans le traitement des tumeurs solides, d'éviter les rechutes dans les cancers hématologiques et de faciliter leur accès en pratique courante. De nombreux essais cliniques évaluant l'efficacité anti-tumorale de l'approche CAR-T cells seule ou en combinaison avec d'autres immunothérapies sont en cours dans le monde. Les résultats obtenus permettront de décrire plus précisément les mécanismes de réponse et d'échappement au traitement afin de mieux les stimuler pour l'un et les contourner pour l'autre. Un travail important doit également être mené pour maîtriser la toxicité de cette approche d'immunothérapie.

### Déclaration de liens d'intérêts :

M.-T. Rubio déclare avoir exercé des activités de consulting pour Servier et participé à des réunions d'experts pour Gilead.

J. Galaine déclare ne pas avoir de liens d'intérêts.

C. Borg déclare exercer des activités d'expertise pour les sociétés MSD, Bayer et Roche.

É. Daguindau déclare ne pas avoir de liens d'intérêts.

Cet article fait partie du numéro supplément *Les cellules CAR-T : une révolution thérapeutique ?* réalisé avec le soutien institutionnel des partenaires Gilead : Kite et Celgene.

## Références

- [1] Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012;12:298-306.
- [2] Rosenberg SA, Spiess P, Lafreniere R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* 1986;233:1318-21.
- [3] Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 2006;314:126-9.
- [4] Johnson LA, Morgan RA, Dudley ME, Cassard L, Yang JC, Hughes MS, et al. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood* 2009;114:535-46.
- [5] Morgan RA, Chinnasamy N, Abate-Daga D, Gros A, Robbins PF, Zheng Z, et al. Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy. *J Immunother* 2013;36:133-51.
- [6] Aleksic M, Liddy N, Molloy PE, Pumphrey N, Vuidepot A, Chang KM, et al. Different affinity windows for virus and cancer-specific T-cell receptors: implications for therapeutic strategies. *Eur J Immunol* 2012;42:3174-9.
- [7] Brocker T. Chimeric Fv-zeta or Fv-epsilon receptors are not sufficient to induce activation or cytokine production in peripheral T cells. *Blood* 2000;96:1999-2001.
- [8] van der Stegen SJ, Hamieh M, Sadelain M. The pharmacology of second-generation chimeric antigen receptors. *Nat Rev Drug Discov* 2015;14:499-509.
- [9] Guest RD, Hawkins RE, Kirillova N, Cheadle EJ, Arnold J, O'Neill A, et al. The role of extracellular spacer regions in the optimal design of chimeric immune receptors: evaluation of four different scFvs and antigens. *J Immunother* 2005;28:203-11.
- [10] Zhao Z, Condomines M, van der Stegen SJ, Perna F, Kloss CC, Gunset G, et al. Structural Design of Engineered Costimulation Determines Tumor Rejection Kinetics and Persistence of CAR T Cells. *Cancer Cell* 2015;28:415-28.
- [11] Hombach AA, Abken H. Costimulation by chimeric antigen receptors revisited: the T cell antitumor response benefits from combined CD28-OX40 signalling. *Int J Cancer* 2011;129:2935-44.
- [12] Maher J, Brentjens RJ, Gunset G, Riviere I, Sadelain M. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor. *Nat Biotechnol* 2002;20:70-5.
- [13] Chmielewski M, Abken H. TRUCKs: the fourth generation of CARs. *Expert opinion on biological therapy* 2015;15:1145-54.
- [14] Chmielewski M, Kopecky C, Hombach AA, Abken H. IL-12 release by engineered T cells expressing chimeric antigen receptors can

- effectively Muster an antigen-independent macrophage response on tumor cells that have shut down tumor antigen expression. *Cancer Res* 2011;71:5697-706.
- [15] Fesnak AD, June CH, Levine BL. Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2016;16:566-81.
- [16] Mikkilineni L, Kochenderfer JN. Chimeric antigen receptor T-cell therapies for multiple myeloma. *Blood* 2017;130:2594-602.
- [17] 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* 2010;18:843-51.
- [18] Ahmed N, Brawley VS, Hegde M, Robertson C, Ghazi A, Gerken C, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2)-Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells for the Immunotherapy of HER2-Positive Sarcoma. *J Clin Oncol* 2015;33:1688-96.
- [19] Bagley SJ, Desai AS, Linette GP, June CH, O'Rourke DM. CAR T Cell Therapy for Glioblastoma: Recent Clinical Advances and Future Challenges. *Neuro Oncol* 2018;20:1429-38.
- [20] Milone MC, O'Doherty U. Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia* 2018;32:1529-41.
- [21] Jin C, Fotaki G, Ramachandran M, Nilsson B, Essand M, Yu D. Safe engineering of CAR T cells for adoptive cell therapy of cancer using long-term episomal gene transfer. *EMBO Mol Med* 2016;8:702-11.
- [22] Pahle J, Walther W. Vectors and strategies for nonviral cancer gene therapy. Expert opinion on biological therapy 2016;16:443-61.
- [23] Bishop DC, Xu N, Tse B, O'Brien TA, Gottlieb DJ, Dolnikov A, et al. PiggyBac-Engineered T Cells Expressing CD19-Specific CARs that Lack IgG1 Fc Spacers Have Potent Activity against B-ALL Xenografts. *Mol Ther* 2018;26:1883-95.
- [24] 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* 2014;2:112-20.
- [25] Smith TT, Stephan SB, Moffett HF, Mcknight LE, Ji W, Reiman D, et al. In situ programming of leukaemia-specific T cells using synthetic DNA nanocarriers. *Nat Nanotechnol* 2017;12:813-20.
- [26] Farber DL, Yudanin NA, Restifo NP. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2014;14:24-35.
- [27] Sadelain M, Riviere I, Riddell S. Therapeutic T cell engineering. *Nature* 2017;545:423-31.
- [28] Qasim W, Zhan H, Samarasinghe S, Adams S, Amrolia P, Stafford S, et al. Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. *Sci Transl Med* 2017;9.
- [29] Bollino D, Webb TJ. Chimeric antigen receptor-engineered natural killer and natural killer T cells for cancer immunotherapy. *Transl Res* 2017;187:32-43.
- [30] Wilkie S, van Schalkwyk MC, Hobbs S, Davies DM, van der Stegen SJ, Pereira AC, et al. Dual targeting of ErbB2 and MUC1 in breast cancer using chimeric antigen receptors engineered to provide complementary signaling. *Journal of clinical immunology* 2012;32:1059-70.
- [31] Ruella M, Barrett DM, Kenderian SS, Shesh-tova O, Hofmann TJ, Perazzelli J, et al. Dual CD19 and CD123 targeting prevents antigen-loss relapses after CD19-directed immunotherapies. *J Clin Invest* 2016;126:3814-26.
- [32] Morsut L, Roybal KT, Xiong X, Gordley RM, Coyle SM, Thomson M, et al. Engineering Customized Cell Sensing and Response Behaviors Using Synthetic Notch Receptors. *Cell* 2016;164:780-91.
- [33] Wu CY, Roybal KT, Puchner EM, Onuffer J, Lim WA. Remote control of therapeutic T cells through a small molecule-gated chimeric receptor. *Science* 2015;350:aab4077.
- [34] Ciceri F, Bonini C, Stanghellini MT, Bon-danza A, Traversari C, Salomoni M, et al. Infusion of suicide-gene-engineered donor lymphocytes after family haploidentical haemopoietic stem-cell transplantation for leukaemia (the TK007 trial): a non-randomised phase I-II study. *The Lancet Oncology* 2009;10:489-500.
- [35] Straathof KC, Pule MA, Yotnda P, Dotti G, Vanin EF, Brenner MK, et al. An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. *Blood* 2005;105:4247-54.
- [36] Turtle CJ, Hanafi LA, Berger C, Gooley TA, Cherian S, Hudecek M, et al. CD19 CAR-T cells of defined CD4+CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *J Clin Invest* 2016;126:2123-38.
- [37] Maus MV, Levine BL. Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy for the Community Oncologist. *Oncologist* 2016;21:608-17.
- [38] Lim WA, June CH. The Principles of Engineering Immune Cells to Treat Cancer. *Cell* 2017;168:724-40.
- [39] Tamada K, Geng D, Sakoda Y, Bansal N, Srivastava R, Li Z, et al. Redirecting gene-modified T cells toward various cancer types using tagged antibodies. *Clin Cancer Res* 2012;18:6436-45.
- [40] Moon EK, Carpenito C, Sun J, Wang LC, Kapoor V, Predina J, et al. Expression of a functional CCR2 receptor enhances tumor localization and tumor eradication by retargeted human T cells expressing a mesothelin-specific chimeric antibody receptor. *Clin Cancer Res* 2011;17:4719-30.
- [41] Hu J, Sun C, Bernatchez C, Xia X, Hwu P, Dotti G, et al. T-cell Homing Therapy for Reducing Regulatory T Cells and Preserving Effector T-cell Function in Large Solid Tumors. *Clin Cancer Res* 2018;24:2920-34.
- [42] Adachi K, Kano Y, Nagai T, Okuyama N, Sakoda Y, Tamada K. IL-7 and CCL19 expression in CAR-T cells improves immune cell infiltration and CAR-T cell survival in the tumor. *Nat Biotechnol* 2018;36(4):346-51.
- [43] Nishio N, Diaconu I, Liu H, Cerullo V, Caruana I, Hoyos V, et al. Armed oncolytic virus enhances immune functions of chimeric antigen receptor-modified T cells in solid tumors. *Cancer Res* 2014;74:5195-205.
- [44] Watanabe K, Luo Y, Da T, Guedan S, Ruella M, Scholler J, et al. Pancreatic cancer therapy with combined mesothelin-redirected chimeric antigen receptor T cells and cytokine-armed oncolytic adenoviruses. *JCI Insight* 2018;3:pii:99573.
- [45] Tanoue K, Rosewell Shaw A, Watanabe N, Porter C, Rana B, Gottschalk S, et al. Armed Oncolytic Adenovirus-Expressing PD-L1 Mini-Body Enhances Antitumor Effects of Chimeric Antigen Receptor T Cells in Solid Tumors. *Cancer Res* 2017;77:2040-51.
- [46] Caruana I, Savoldo B, Hoyos V, Weber G, Liu H, Kim ES, et al. Heparanase promotes tumor infiltration and antitumor activity of CAR-redirected T lymphocytes. *Nat Med* 2015;21:524-9.
- [47] Wang LC, Lo A, Scholler J, Sun J, Majumdar RS, Kapoor V, et al. Targeting fibroblast activation protein in tumor stroma with chimeric antigen receptor T cells can inhibit tumor growth and augment host immunity without severe toxicity. *Cancer Immunol Res* 2014;2:154-66.
- [48] Feig C, Jones JO, Kraman M, Wells RJ, Deonarine A, Chan DS, et al. Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:20212-7.
- [49] Kloss CC, Lee J, Zhang A, Chen F, Melenhorst JJ, Lacey SF, et al. Dominant-Negative TGF-beta Receptor Enhances PSMA-Targeted Human CAR T Cell Proliferation And Augments Prostate Cancer Eradication. *Mol Ther* 2018;26:1855-66.
- [50] Moon EK, Wang LC, Dolfi DV, Wilson CB, Ranganathan R, Sun J, et al. Multifactorial T-cell hypofunction that is reversible can limit the efficacy of chimeric antigen receptor-transduced human T cells in solid tumors. *Clin Cancer Res* 2014;20:4262-73.