



# Développement des CAR T cells : passé, présent et futur

*Development of CAR T cells: past, present and future*

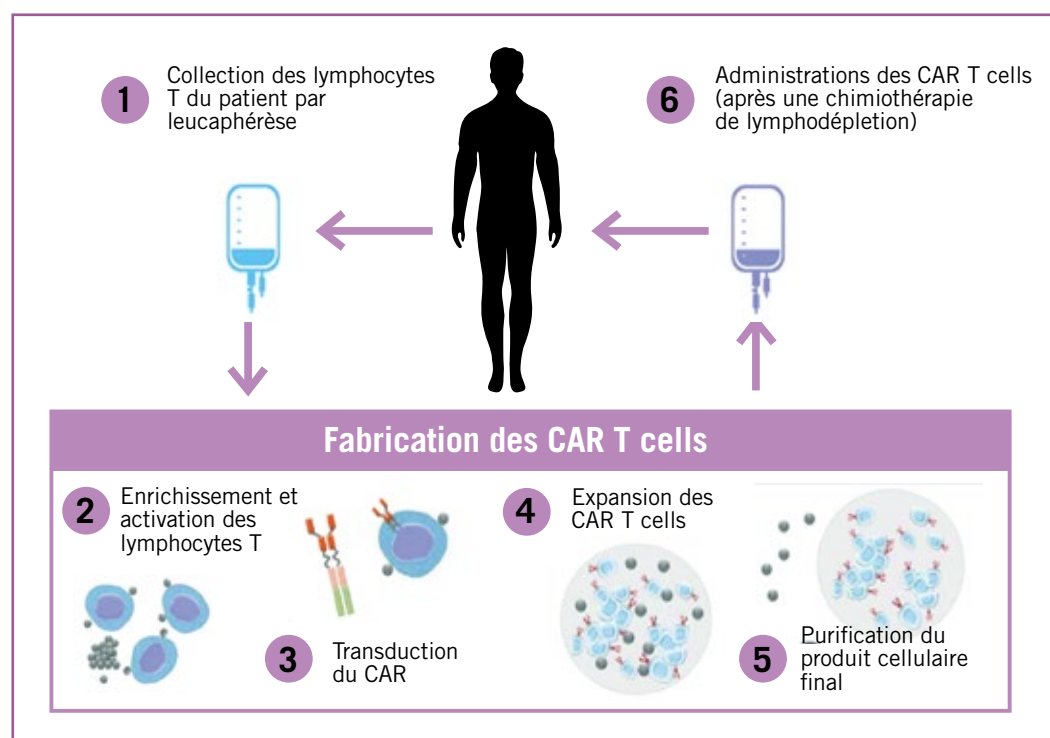
Les *Chimeric Antigen Receptor* (CAR) T cells sont des lymphocytes T modifiés génétiquement pour exprimer un récepteur capable de rediriger leur spécificité contre les cellules tumorales. Dans cet article, nous décrivons les grands principes de fabrication des CAR T cells et les voies d'amélioration qui sont envisagées.

*Chimeric Antigen Receptor (CAR) T cells are T lymphocytes which have been genetically engineered to be "redirected" against tumor cells. Here we describe the manufacturing of CAR T-cells as well as ongoing developments.*

Les *Chimeric Antigen Receptor* (CAR) T cells sont des lymphocytes T modifiés génétiquement pour exprimer un récepteur de surface capable de reconnaître un antigène de tumeur. Le récepteur est dit chimérique car il est composé d'une partie extracellulaire qui reconnaît l'Ag à la manière d'un anticorps, donc de façon indépendante du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), et d'une partie intracellulaire qui mime les signaux d'activation du récepteur T (TCR)<sup>(1,2)</sup>. Les CAR T cells appartiennent à la catégorie des médicaments de thérapie innovante (MTI). Les MTI sont des médicaments à usage humain qui comprennent la thérapie génique, la thérapie cellulaire somatique, l'ingénierie tissulaire et les médicaments combinés de thérapie innovante. Ils sont régis par le règlement n° 2007/1394 du Parlement européen.

## Fabrication

La fabrication de CAR T cells autologues se déroule *ex vivo* en plusieurs étapes. Le patient subit d'abord une leucaphérèse dans une unité de thérapie cellulaire. Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) ainsi collectées sont envoyées (fraîches ou congelées) au laboratoire qui va transformer les lymphocytes T en CAR T cells (**figure 1**). Les lymphocytes T sont isolés et activés *in vitro*, en général par des anticorps anti-CD3 +/- anti-CD28 et en présence de cytokines. Le récepteur chimérique est alors transduit dans les lymphocytes T, le plus souvent grâce à un vecteur rétro- ou lentiviral. Les lymphocytes sont ensuite amplifiés puis congelés avant d'être adressés au Centre de soin. Avant l'injection des CAR T cells, le patient reçoit une chimiothérapie



## Auteurs



**Roch HOUOT**  
PU-PH  
Hématologie Clinique  
CHU de Rennes

**Expertise :**  
Lymphome,  
immunothérapie,  
CAR T cells

**Correspondance :**  
Service d'Hématologie  
Clinique, CHU de Rennes,  
Université de Rennes,  
INSERM U1236, EFS,  
Rennes, France.  
[roch.houot@univ-rennes1.fr](mailto:roch.houot@univ-rennes1.fr)

**Co-auteur :**



**Marion ALCANTARA**  
Chef de clinique  
Institut Curie, Université  
Paris Sciences et  
Lettres, INSERM U932,  
75005 Paris, France.  
[marion.alcantara@curie.fr](mailto:marion.alcantara@curie.fr)

**Liens d'intérêts :**  
Bristol-Myers Squibb,  
MSD, Gilead, Kite,  
Roche, Novartis,  
Janssen, et Celgene.

Figure 1 : étapes de fabrication des CAR T cells .



lymphodéplétante, à base de fludarabine et d'endoxan le plus souvent<sup>(3)</sup>. Celle-ci facilite la prolifération homéostatique des CAR T cells et leur persistance en augmentant les taux d'IL-7 et IL-15 disponibles<sup>(4)</sup>.

### Récepteurs chimériques

Les technologies permettant de modifier génétiquement les lymphocytes T pour leur faire exprimer un récepteur chimérique ont été développées à partir des années 1990. La 1<sup>ère</sup> génération de CAR T cells comportait un fragment variable d'immunoglobuline (scFv) au niveau extracellulaire et une molécule d'activation du T cell receptor (TCR), généralement le CD3 $\zeta$ , au niveau intracellulaire. Leur efficacité clinique était faible du fait d'une expansion et d'une persistance *in vivo* très limitées<sup>(5,6)</sup>. L'adjonction d'un signal de costimulation (CD28 ou 4-1BB le plus souvent) destiné à mimer le « signal 2 » nécessaire à l'activation optimale d'un lymphocyte T a donné naissance aux CAR T cells de deuxième génération. Ceux-ci sont capables de s'expandre et de persister de façon plus efficace. Deux de ces CAR T cells de seconde génération, axicabtagene ciloleucel et tisagenlecleucel, ont été approuvés par la *Food and Drug Administration* (FDA) et l'Agence Européenne des Médicaments (EMA) pour le traitement des leucémies aiguës lymphoblastiques B (LAL-B) et des lymphomes B non Hodgkiniens (LNH-B)<sup>(7)</sup>. La structure du récepteur chimérique a un impact sur le phénotype, le métabolisme, la fonction, et la persistance des CAR T-cells (figure 2). Les CAR T cells avec une costimulation CD28 sont généralement associés à une prolifération plus intense et à un phénotype « effecteur mémoire », alors que les CAR avec une costimulation 4-1BB s'accompagnent d'une réponse plus progressive, d'une persistance prolongée et d'une différenciation de type « centrale mémoire »<sup>(8)</sup>. Une troisième génération de CAR

T cells est en cours de développement qui comporte un domaine de costimulation additionnel (CD28, 4-1BB, ICOS, OX40, CD27 ou NKG2D) mais leur supériorité clinique reste à démontrer.

Les CAR T cells peuvent également être équipés de gènes visant à modifier le microenvironnement tumoral ou à les rendre résistants à l'immunosuppression induite par la tumeur. Certains CARs, appelée TRUCK (T cells *redirected for universal cytokine killing*), sont conçus pour sécréter des cytokines immunostimulantes telle que l'IL-12 ou l'IL-18<sup>(1)</sup>. D'autres expriment le ligand de 4-1BB (4-1BBL) dans le but de fournir un signal de costimulation aux lymphocytes T adjacents infiltrant la tumeur<sup>(9)</sup>. Enfin, certains CAR T cells co-expriment des récepteurs dominants négatifs (induisant donc une perte de fonction) de certains checkpoints (PD1 ou TGF $\beta$  notamment) qui les rendent résistants à ces signaux inhibiteurs<sup>(10)</sup>.

Enfin, pour limiter ou contrôler la toxicité des CAR T cells, certaines constructions incluent une expression conditionnelle du CAR (récepteurs synNotch) ou encore un interrupteur de sécurité (*safety switch*) grâce à un gène suicide<sup>(11)</sup> ou à une molécule permettant d'éliminer les CAR T cells. Certains CAR T cells sont par exemple modifiés génétiquement pour exprimer un mimotope du CD20 ou d'EGFR, ce qui permet leur élimination par le rituximab ou le cetuximab si nécessaire.

### Ingénierie génétique

Les  $\gamma$ -rétrovirus ont été les premiers vecteurs utilisés pour la fabrication des CAR T cells<sup>(12)</sup>, avant d'être progressivement remplacés par les lentivirus. Ces derniers sont théoriquement capables d'infecter même les cellules qui ne sont pas en division alors que les  $\gamma$ -rétrovirus n'infectent que les cellules en division. Ces virus s'intègrent de façon semi-aléatoire dans le génome

Figure 2 : structure d'un CAR-T de 2<sup>ème</sup> génération et rôle des différents composants (adapté de Sadelain et al, *Nature* 2017).

#### Traduction :

*Antigen binding* = Liaison à l'antigène

*Epitope* = épitope

*Affinity* = Affinité

#### Structure

*Affects binding* = Affecte la liaison

*Affects function* = Affecte la fonction

#### Costimulation

*Function* = Fonction

*Metabolism* = Métabolisme

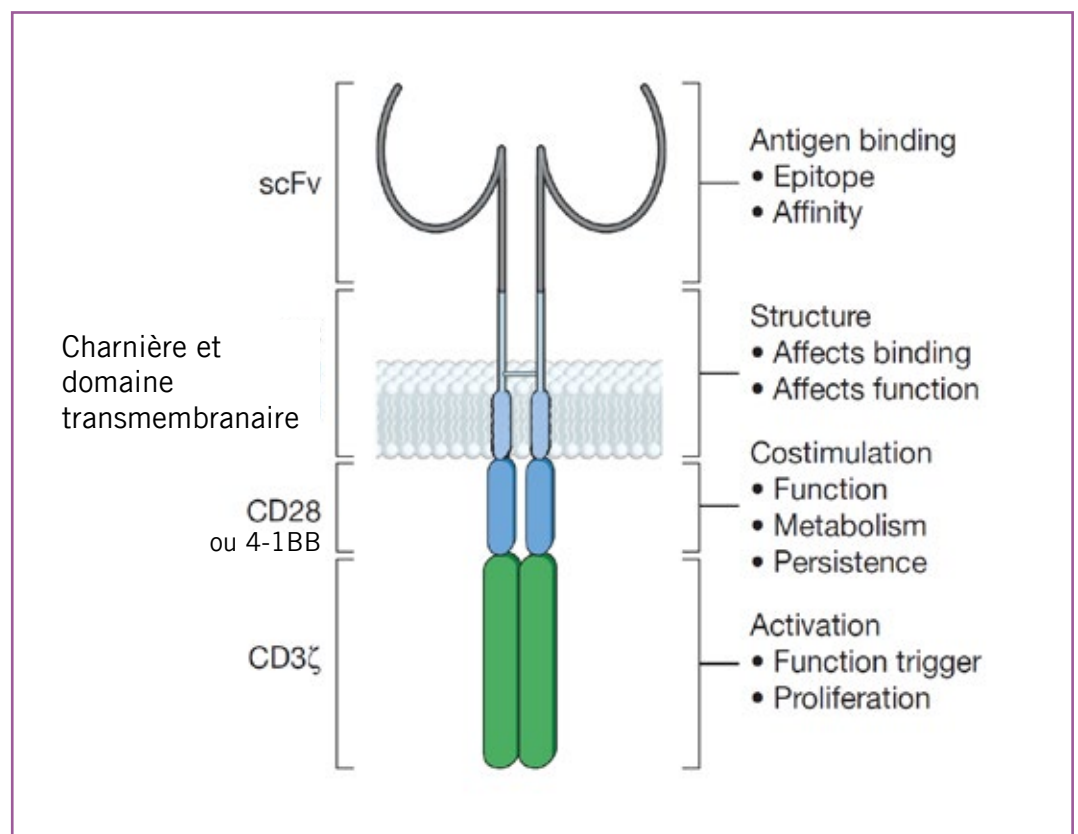
*Persistence* = Persistance

#### Activation

*Function trigger* = Active la fonction

*Proliferation* = Prolifération

scFv = fragment variable d'immunoglobuline





humain, préférentiellement près des sites d'initiation de la transcription pour les  $\gamma$ -rétrovirus et plutôt en intra-génique pour les lentivirus. Ces techniques de transduction virale sont complexes et coûteuses. D'autres techniques d'insertion sont en développement, notamment des systèmes de type transposon (*Sleeping Beauty*, PiggyBac), de transfection d'ARN messager (expression transitoire du gène), ou d'édition du génome (CRISPR/Cas9 notamment)<sup>(12)</sup>. Cette dernière permet de réaliser une insertion dirigée du gène chimérique, en lieu et place du locus du TCR (chaîne  $\alpha$ ) (TRAC-CAR). Certaines études précliniques suggèrent en effet que cette insertion diminuerait l'exhaustion des CAR T cells et augmenterait leur efficacité<sup>(13)</sup>.

## Cibles

Les CAR T cells dirigés contre la molécule CD19 sont les plus avancés dans leur développement et les premiers à avoir été approuvés par les autorités de santé. CD19 est une cible de choix du fait de son expression intense et homogène dans un grand nombre d'hémopathies B et de sa faible expression dans les tissus normaux hormis par les lymphocytes B normaux (la lymphopénie B est généralement bien tolérée et ses conséquences peuvent être traitées, si besoin, par une supplémentation en immunoglobulines polyvalentes). Des CAR T cells dirigés contre BCMA pour le traitement du myélome sont également avancés dans leur développement<sup>(14)</sup>. Enfin, des CAR T cells dirigés contre d'autres cibles sont développés afin de traiter les hémopathies lymphoïdes T<sup>(15)</sup> et myéloïdes<sup>(16)</sup>.

Chez les patients qui rechutent, il est fréquent d'observer un échappement lié à une perte de la cible par les cellules tumorales<sup>(17)</sup>. Pour prévenir ces résistances, des CAR T cells « multispécifiques » (CD19-CD20 par exemple) ont été développés. Cette stratégie est en cours d'évaluation clinique<sup>(18)</sup>.

## Sources cellulaires

Actuellement, la plupart des CAR T cells sont de nature autologue. La composition cellulaire du produit injecté est le plus souvent variable d'un patient à l'autre. Certaines données précliniques suggèrent que le ratio CD4/CD8 et le phénotype (naïf, central mémoire, effecteur mémoire, effecteur) des CAR T cells pourraient avoir un impact sur leur efficacité et leur toxicité, même si ceci reste à démontrer en clinique<sup>(19)</sup>. Des stratégies visant à modifier la composition ou les propriétés des CAR sont en cours d'évaluation, en agissant avant la leucaphérèse (*in vivo*) ou lors de leur production (*ex vivo*)<sup>(20)</sup>.

Les CAR T cells autologues sont fabriqués individuellement

pour chaque patient. Ceci s'accompagne d'un délai de production parfois long (2 à 4 semaines environ), d'une lourdeur logistique et de coûts importants. Pour répondre à ces problèmes, des CAR T cells « universels », produits à partir de cellules allogéniques, sont en cours de développement<sup>(21)</sup>. Ces CAR T cells allogéniques exposent le patient à un risque de maladie du greffon contre l'hôte (GVH) qui peut être prévenu par la délétion du TCR endogène des lymphocytes T, par l'utilisation de lymphocytes n'induisant pas d'alloréactivité (cellules NK<sup>(22)</sup>, NKT, lymphocytes T  $\gamma\delta$  ou MAIT) ou encore par l'utilisation de lymphocytes T mémoires virus spécifiques qui présentent un répertoire TCR restreint. Toutefois, cette approche pose le problème du rejet allogénique des CAR T cells par les cellules immunitaires du receveur et donc de leur persistance. Ces approches sont actuellement en cours d'évaluation clinique.

## Combinaisons

Parallèlement aux stratégies visant à modifier les CAR T cells eux-mêmes, un certain nombre d'études tentent de les combiner avec d'autres traitements, notamment des thérapies ciblées (ibrutinib par exemple) ou des inhibiteurs de checkpoints immunitaires (anti PD-1/PD-L1 notamment). À titre d'exemple, l'équipe de M. Ruella a rapporté que l'adjonction d'ibrutinib améliore l'efficacité de CAR T cells anti-CD19 dans un modèle murin de xénogreffe de lymphome à cellules du manteau.<sup>(23)</sup> De façon intéressante, l'ibrutinib est associé à une réduction de l'expression des marqueurs d'exhaustion (PD-1, TIM-3, LAG-3) par les CAR T cells lorsque ceux-ci sont mis en culture avec la lignée cellulaire. Chez les patients, des analyses préliminaires suggèrent que l'association d'ibrutinib aux CAR T cells anti-CD19 augmenterait les taux de réponse et diminuerait les syndromes de relargage de cytokines sévères. Toutefois, des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ces résultats.

## Conclusion

Les CAR T cells ont ouvert un champ thérapeutique nouveau en onco-hématologie. Grâce aux techniques d'ingénierie moléculaire, il est désormais possible de programmer une cellule immunitaire pour la diriger contre les cellules cancéreuses. Les CAR T cells anti-CD19 de 2<sup>ème</sup> génération ont fourni la preuve que ce concept thérapeutique était efficace et ont conduit aux premières autorisations de mise sur le marché. Des efforts importants sont en cours pour augmenter leur efficacité, diminuer leur toxicité et étendre leurs indications à d'autres cancers.

### Ce qu'il faut retenir

- Les CAR T cells sont des lymphocytes T modifiés génétiquement qui expriment un récepteur chimérique les rendant capables de reconnaître et détruire les cellules tumorales.
- Les CAR se composent d'une partie extracellulaire, constituée d'un domaine de liaison à l'antigène de type anticorps, et d'un domaine de signalisation intracellulaire, qui délivre un signal d'activation mimant celui du récepteur T (TCR).
- Deux CAR T cells anti-CD19 de deuxième génération ont obtenu une autorisation de mise sur le marché pour le traitement des lymphomes diffus à grandes cellules B et des leucémies aiguës lymphoblastiques B en rechute/réfractaires.
- Les possibilités d'optimisations pour augmenter leur efficacité et/ou réduire leur toxicité sont nombreuses et variées.

## Références

1. Sadelain M, Rivière I, Riddell S. *Therapeutic T cell engineering. Nature. 2017 24;545(7655):423–31.*
2. June CH, Sadelain M. *Chimeric Antigen Receptor Therapy. N Engl J Med. 2018 05;379(1):64–73.*
3. Yakoub-Agha I, Chabannon C, Bader P, Basak GW, Bonig H, Ciceri F, et al. *Management of adults and children undergoing CAR t-cell therapy: best practice recommendations of the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) and the Joint Accreditation Committee of ISCT and EBMT (JACIE). Haematologica. 2019 Nov 21;*
4. Gattinoni L, Finkelstein SE, Klebanoff CA, Antony PA, Palmer DC, Spiess PJ, et al. *Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8+ T cells. J Exp Med. 2005 Oct 3;202(7):907–12.*
5. Eshhar Z, Waks T, Gross G, Schindler DG. *Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Jan 15;90(2):720–4.*
6. Sadelain M, Brentjens R, Rivière I. *The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors. Curr Opin Immunol. 2009 Apr;21(2):215–23.*
7. Sadelain M, Brentjens R, Rivière I. *The basic principles of chimeric antigen receptor design. Cancer Discov. 2013 Apr;3(4):388–98.*
8. 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. 2016 Feb 16;44(2):380–90.*
9. Zhao Z, Condomines M, van der Stegen SJC, Perma 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 Oct 12;28(4):415–28.*
10. Cherkassky L, Morello A, Villena-Vargas J, Feng Y, Dimitrov DS, Jones DR, et al. *Human CAR T cells with cell-intrinsic PD-1 checkpoint blockade resist tumor-mediated inhibition. J Clin Invest. 2016 01;126(8):3130–44.*
11. Straathof KC, Spencer DM, Sutton RE, Rooney CM. *Suicide genes as safety switches in T lymphocytes. Cytotherapy. 2003;5(3):227–30.*
12. Rivière I, Sadelain M. *Chimeric Antigen Receptors: A Cell and Gene Therapy Perspective. Mol Ther J Am Soc Gene Ther. 2017 03;25(5):1117–24.*
13. Eyquem J, Mansilla-Soto J, Giavridis T, van der Stegen SJC, Hamieh M, Cunanan KM, et al. *Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. Nature. 2017 02;543(7643):113–7.*
14. Raje N, Berdeja J, Lin Y, Siegel D, Jagannath S, Madduri D, et al. *Anti-BCMA CAR T-Cell Therapy bb2121 in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. N Engl J Med. 2019 02;380(18):1726–37.*
15. Alcantara M, Tesio M, June CH, Houot R. *CAR T-cells for T-cell malignancies: challenges in distinguishing between therapeutic, normal, and neoplastic T-cells. Leukemia. 2018 Nov;32(11):2307–15.*
16. Cummins KD, Gill S. *Chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute myeloid leukemia: how close to reality? Haematologica. 2019;104(7):1302–8.*
17. Majzner RG, Mackall CL. *Tumor Antigen Escape from CAR T-cell Therapy. Cancer Discov. 2018;8(10):1219–26.*
18. Shah NN, Maatman T, Hari P, Johnson B. *Multi Targeted CAR-T Cell Therapies for B-Cell Malignancies. Front Oncol. 2019;9:146.*
19. Sommermeyer D, Hudecek M, Kosasih PL, Gogishvili T, Maloney DG, Turtle CJ, et al. *Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8+ and CD4+ subsets confer superior antitumor reactivity in vivo. Leukemia. 2016 Feb;30(2):492–500.*
20. Brudno JN, Kochenderfer JN. *Chimeric antigen receptor T-cell therapies for lymphoma. Nat Rev Clin Oncol. 2018 Jan;15(1):31–46.*
21. Depil S, Duchateau P, Grupp SA, Mufti G, Poirot L. *“Off-the-shelf” allogeneic CAR T cells: development and challenges. Nat Rev Drug Discov. 2020 Jan 3;*
22. Liu E, Marin D, Banerjee P, Macapinlac HA, Thompson P, Basar R, et al. *Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors. N Engl J Med. 2020 06;382(6):545–53.*
23. Ruella M, Kenderian SS, Shestova O, Fraietta JA, Qayyum S, Zhang Q, et al. *The Addition of the BTK Inhibitor Ibrutinib to Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor T Cells (CART19) Improves Responses against Mantle Cell Lymphoma. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2016 01;22(11):2684–96.*



**1<sup>er</sup> Avril 2020 : Lancement du 4<sup>ème</sup> Appel à Projets de Recherche de la Fédération Leucémie Espoir**

**Mars 2020 : Ouverture du programme PASCA aux patients atteints de sarcomes**  
**Deuxième trimestre 2020 : Lancement d'une campagne de communication autour du programme PASCA auprès des médecins généralistes et spécialistes**

Retrouvez nos actualités et suivez nos projets solidaires !

[www.leucemie-espoir.org](http://www.leucemie-espoir.org)

facebook

“ Toute douleur qui n'aide  
 personne est absurde.  
 André Malraux ”



**PASCA**  
 Parcours de Santé au cours du Cancer

**Globulo Quest**

