



RONÉOS DFGSP2 2020 - 2021

UE PL2.8: BPC 13-14

Date : 21/10

Plage horaire : 10h30/12h30

Enseignant : MERCHED Aksam

N°ISBN :

Ronéistes : Serena Clara : clara.serena33@gmail.com

Ducouvent Thomas: 2tomnico@gmail.com

Thérapie cellulaire

Plan du cours :

I - Rappels sur le système immunitaire et mécanismes immunosuppresseifs

A - Mécanisme immunosuppresseif

1- Système PD1 - PDL1

2- AC monoclonaux

B - Rappels sur la signalisation et le fonctionnement des cellules du système immunitaire

1- Lymphocyte T

a - T auxiliaire

b - T cytotoxique

2- Lymphocyte B

C- Immunosuppression par PD1-PDL1 : checkpoint

D- Activation des LT

1- Signal 1

2- Signal 2

3- Signal 3

II - Principe de la technologie CAR-T cells

A- Structure d'un récepteur chimérique

B- Génération des CAR-T

1- Génération 1

2- Génération 2

3- Génération 3

C- Application clinique protocole des CAR-T

III - Procédure de mise en place-essais clinique

A- Premier succès des CAR-T

B-La Technologie TALEN (transcription activator-like effector nucleases)

C- CRISPR-CAS9

1- Emmanuelle Charpentier

2- la technique

3- CRISP edit

IV - Effets secondaires et suivi clinique

A- Les essais cliniques

B- Les effets secondaires

1- Est ce qu'on peut minimiser ces effets cliniques secondaire?

2- Classification de ces effets secondaires

V - Amélioration et futures générations CAR-T

A- Résistance au traitement

B- Essai clinique de phase 1

C- Technologie CAR T bi spécifique

I - Rappels sur le système immunitaire et mécanismes immunosuppresseurs

L'immunothérapie : Comment voit-on l'état du système immunitaire chez les patients atteints de cancer ?

Leur système est fonctionnel a priori. Normalement les patients ont une immunité presque normale vis à vis des infections, des fonctions classiques de défense. Néanmoins il tolère aussi les cellules cancéreuses.

A - Mécanisme immunosuppresseur

1- Système PD1 - PDL1

De quelle manière ces cellules cancéreuses vont évasion nos réponses immunitaires ?

Grâce à l'expression de PDL1 par les cellules immunitaires. L'interaction du récepteur et de son ligand envoie des signaux d'inhibition, d'immunosuppression. Si une cellule tumorale exprime PD1 certaines cellules immunitaires peuvent exprimer le ligand de ce récepteur, donc l'interaction de PD1 avec son ligand inhibe la réponse immunitaire. De cette manière là le système immunitaire va tolérer la présence des cellules cancéreuses.

Evidemment toutes les cellules tumorales n'expriment pas PD1 ou son ligand. C'est une stratégie pour échapper au contrôle par le système immunitaire.

2 - AC monoclonaux

Maintenant on utilise des AC monoclonaux qui visent PD1 ou son ligand pour empêcher cette immunosuppression. Cela fait partie des stratégies d'immunothérapie actuelles. Il existe des médicaments sous forme d'AC monoclonaux qui inhibent l'interaction entre PD1 et son ligand. On lève le freinage au niveau système immunitaire.

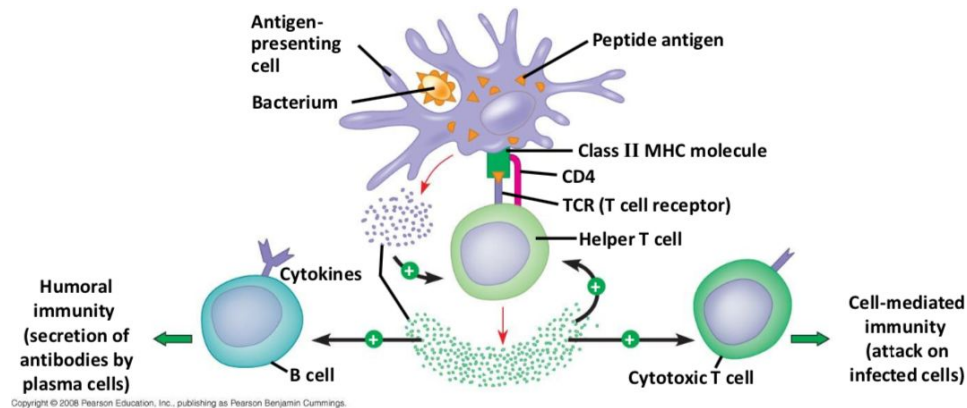
B - Rappels sur la signalisation et le fonctionnement des cellules du système immunitaire :

1 - Lymphocyte T (LT)

a. Les lymphocytes T auxiliaires

Le LT auxiliaire (T helper) exprime le marqueur de surface CD4. Il orchestre la réponse immunitaire. CD4 va interagir avec le marqueur d'histocompatibilité CMH. CMH présente l'antigène à l'antigène d'origine bactérien ou viral que le système (comme une CPA par exemple) va présenter à ses lymphocytes pour voir si il y a une tolérance. Si c'est un AC étranger on le considère comme une menace à éliminer.

La liaison des CD4 avec le TCR (récepteur des LT) active les LT auxiliaire. Cette activation se traduit par la production des facteurs inflammatoire : les cytokines et ces facteurs activent à la fois les LT cytotoxiques et les LB.

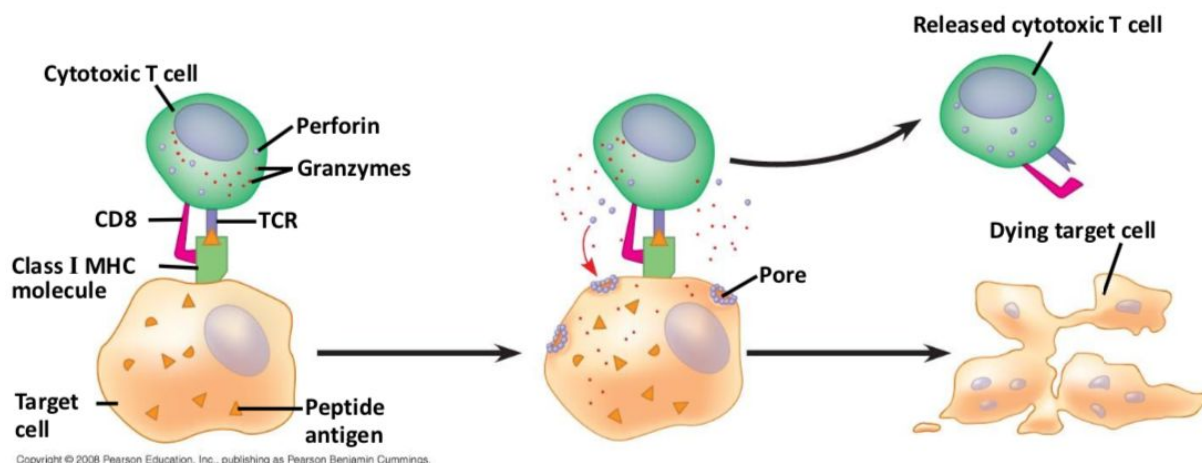


b. Les lymphocytes T cytotoxiques

Les LT cytotoxiques expriment le marqueur de surface CD8 : ils s'attaquent directement à leur cible cellulaire pour les détruire.

Se sont les cellules effectrices (les soldats du système immunitaire). L'interaction avec une CPA s'effectue grâce aux marqueurs CD8 mais il existe aussi une ligation entre le récepteur de ces lymphocytes avec l'AG présenté par la CMH.

La particularité de la réponse : on a une batterie de solution de facteurs que l'on peut sécréter (cytokines, perforines (peuvent créer des pores),enzymes de destructions). Une fois activés, ces LT CD8 vont sécrétés ces enzymes qui permettent de perforer la membrane en créant des pores au niveau des cellules cibles et de la détruire complètement. La menace est éliminée grâce à ces LT , puis ces derniers se détachent et vont détruire d'autres cellules.

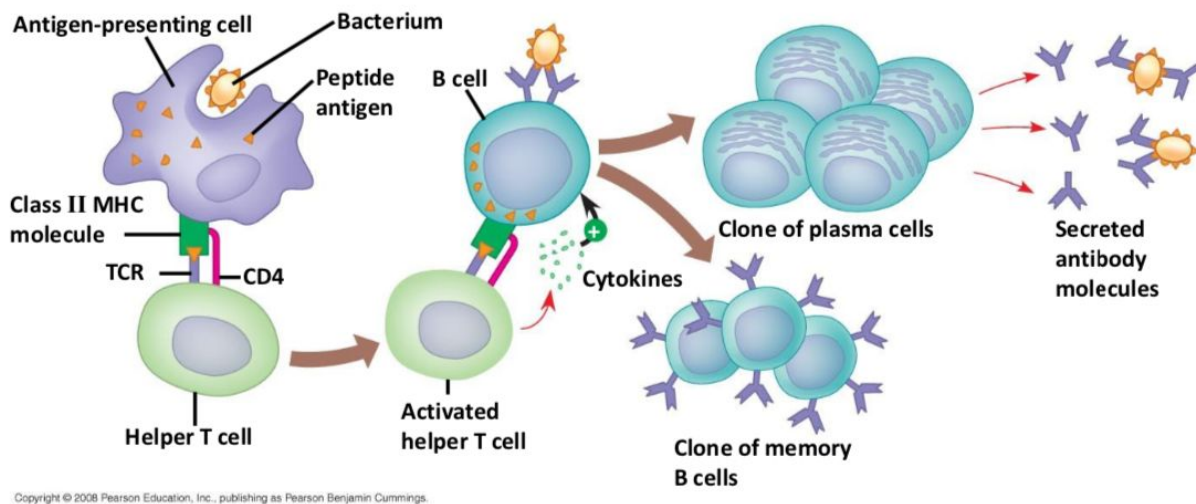


On appelle ça l'**immunité cellulaire**.

2 - Lymphocyte B

Il y a une similitude d'interaction mais les marqueurs sont différents. Une fois activés les LT auxiliaires vont induire l'activation des LB, en leur présentant l'AG étranger. Les LB se différencient alors en plasmocytes et vont alors produire des AC spécifiques à l'AG. Ils deviennent alors des cellules sécrétrices d'AC.

On appelle ça **l'immunité humorale** : immunité via les AC.



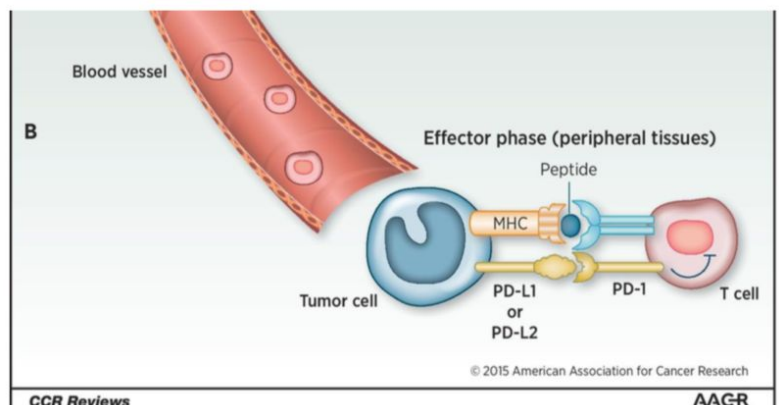
Remarque : le TNF alpha est un facteur sécrété par les LT cytotoxique qui induit la nécrose des cellules cibles tumorales.

C- Immunosuppression par PD1 - PDL1 : checkpoint

Si une cellule infectée ou une cellule tumorale est capable d'exprimer PD1 à sa surface , cette expression se traduit par une immunosuppression.

Ici une cellule tumorale présente un peptide tumoral et en même temps le ligand de PD1. Cela se traduit par une inhibition. La signalisation de PD1 va envoyer une cascade de messagerie pour inhiber la réponse des lymphocytes.

Immunosuppression via PD-1/PD-L1 checkpoint blockade



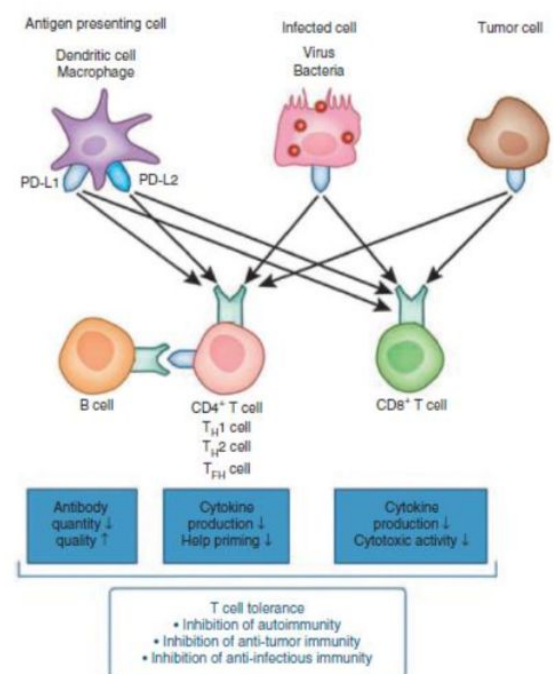
PD1 n'est pas une nouvelle protéine créée par les cellules cancéreuses. C'est une molécule normalement exprimée par n'importe quelle cellule (comme les CPA, un lymphocyte, une cellule infectée par une bactérie ou un virus, ou même une cellule tumorale).

De manière générale, elle permet de contrôler le système immunitaire pour éviter une réponse excessive, auto-immune. Elle permet à un moment donné d'induire une résolution de cette réponse immunitaire ou inflammatoire. Elle fait partie du système de contrôle après une réaction ou une réponse inflammatoire. Exprimer PD1 aboutit au freinage à l'arrêt de la réponse immunitaire.

Les cellules tumorales (à droite) ne font que utiliser cette manière de contrôle, exprimer un ligand PDL1 ou PDL2.

En bas, les LT cytotoxiques et auxiliaires expriment le PD1. L'interaction de PD1 et son ligand induit l'arrêt ou l'inhibition de la prolifération des cellules effectrices, de la production des AC par les LB.

Globalement son rôle est de freiner les différents agents du système immunitaire.



D- L'activation des LT

Si l'on veut connaître en détail l'activation des LT on doit connaître leur manière d'activation la plus optimale, car la technologie que l'on va expliquer par la suite vise à activer ces LT.

L'activation des LT nécessite 3 types de signaux :

1- Signal 1

C'est la stimulation via l'AG présenté par une CPA. Le récepteur impliqué est le TCR en interaction avec le CD3 (présent sur tous les LT).

Du côté intracellulaire on a la présence d'une protéine clef ZAP 70 , essentielle à la signalisation via le TCR. La stimulation via l'AG active ZAP 70 qui envoie une cascade de signalisation via la phospholipase C gamma. En aval , on a l'activation de facteur de transcription (AP1, NFAT, NFkB) qui vont reconnaître des promoteurs spécifiques de certains gènes faisant partis de la réponse immunitaire. On aura alors la transcription de ces derniers.

2- Signal 2

Le signal 1 n'est pas suffisant, nous avons besoin d'une costimulation = le signal 2 effectué grâce au récepteur CD28. Il nécessite la signalisation par la PI3 kinase , AKT qui induit l'activation de facteur de transcription. La signalisation s'effectue via AP1 , NFAT et NFkB.

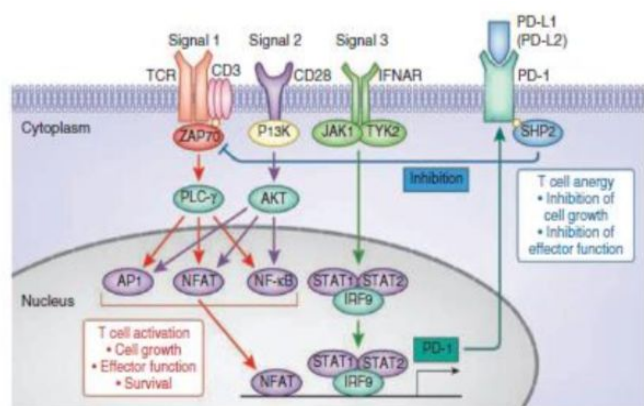
On a donc ajouté un autre facteur de transcription , ou un autre inducteur de ces facteurs de transcription. Le signal est alors plus fort. Si on fait 1 + 2 on a un signal plus fort de ces facteurs de transcription.

3- Signal 3

Pour compléter l'activation de ces LT , nous avons besoin d'un 3ème signal qui va se déclencher suite à la présence de certaines cytokines qui vont être reconnues par un récepteur spécifique. (ex ici est l'interféron Gamma , ça peut être TNF alpha). A travers ce signal 3 la signalisation aboutit aussi à activer d'autres facteurs de transcription et d'autres gènes.

T cells are activated by :

- **signal 1 (antigen stimulation),**
- **signal 2 (costimulation) and**
- **signal 3 (inflammatory cytokines).**



Ces 3 signaux collaborent pour avoir une activation complète et optimale des LT. A travers ces signaux on a déclenché la réponse immunitaire et à la fin de cette dernière , le gène PD1 est induit pour inhiber cette réponse.

PD1 supprime l'activation des LT , en recrutant SHP2 (qui est une phosphatase). Cette dernière va déphosphoryler et inactiver ZAP70. C'est un signal de rétro inhibition pour freiner l'activation des LT.

II - Principe de la technologie CAR-T cells

Le principe de la thérapie cellulaire CAR-T est de transformer les LT des patients , en super lymphocyte , réinjectés chez des mêmes patients. Après réinjection ces LT vont prendre en charge la destruction et l'élimination des cellules cancéreuses.

CAR-T : **Chimeric Antigen Recepteur - T** (pour lymphocyte T)

Un récepteur chimérique n'est pas un récepteur produit par les cellules , c'est une construction. Ce n'est pas un récepteur natif des cellules.

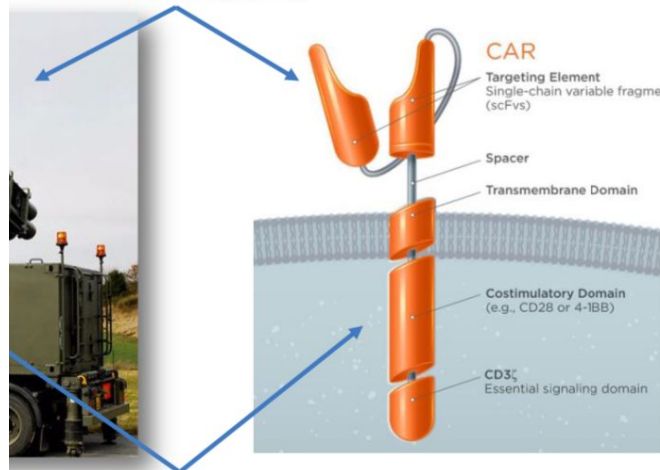
A- Structure d'un récepteur chimérique :

Le domaine extracellulaire contient le fragment variable de la chaîne d'un AC. C'est la partie qui reconnaît un AG tumorale. On peut modifier ce domaine EC pour qu'il reconnaisse n'importe quel AG , il suffit d'identifier un AG tumorale et on crée l'AC ou la partie spécifique de l'AC pour fixer l'AG.

Par exemple ça peut être une partie complémentaire qui reconnaît le CD19 marqueur des LB normaux mais aussi tumoraux. Au niveau de lymphomes on peut en avoir de type B, les LB prolifèrent de manière anarchique ce sont des cellules tumorales. Donc via la conception de ce récepteur chimérique on décide de viser le CD19.

Nous avons aussi le domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique de transduction des signaux , sur lequel on peut jouer pour inclure le maximum d'éléments d'activation des LT.

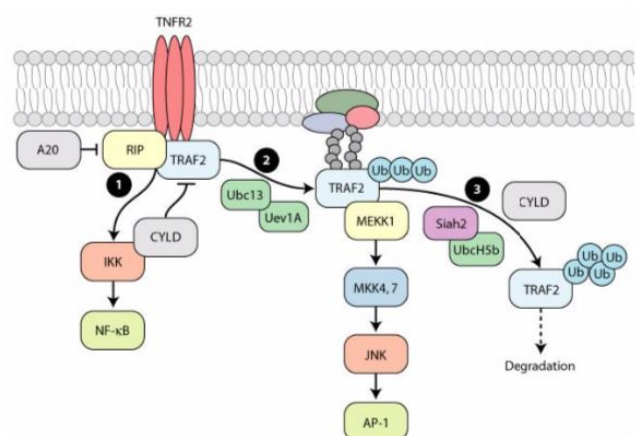
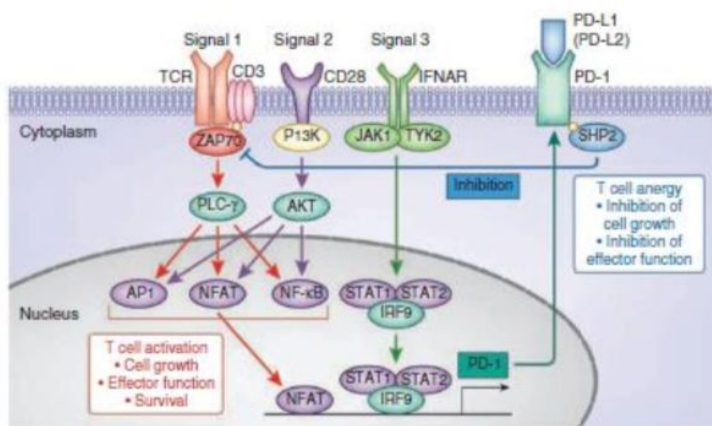
Système de détection et d'interception



Système d'activation d'attaque

On a un système d'interception et d'élimination tumoral, qui détecte l'AG tumoral et une fois reconnue il y a déclenchement du système d'activation pour éliminer la cellule ou les cibles ennemies.

On a vu que certaines protéines sont clefs pour l'activation des LT comme ZAP70 du signal 1, CD28 et PI3k du signal 2. TNF alpha (récepteur des cytokines), ou bien l'interféron qui participe au signal 3. Cela peut être aussi le TNFR2 qui active à sa manière au niveau du troisième signal d'activation des lymphocytes. Il faut choisir dans chaque signal un élément pour avoir une réponse efficace au niveau des lymphocytes T.



B - Plusieurs génération de CAR-T :

1- Génération 1

On a mis ZAP70 et la molécule clef pour la signalisation 1 (reconnaissance de AG. On voit que la cytotoxicité du lymphocyte qui exprime ce récepteur est très bien. Mais il n'y a pas de production normale de cytokines , la prolifération n'est pas parfaite. La survie des LT non plus.

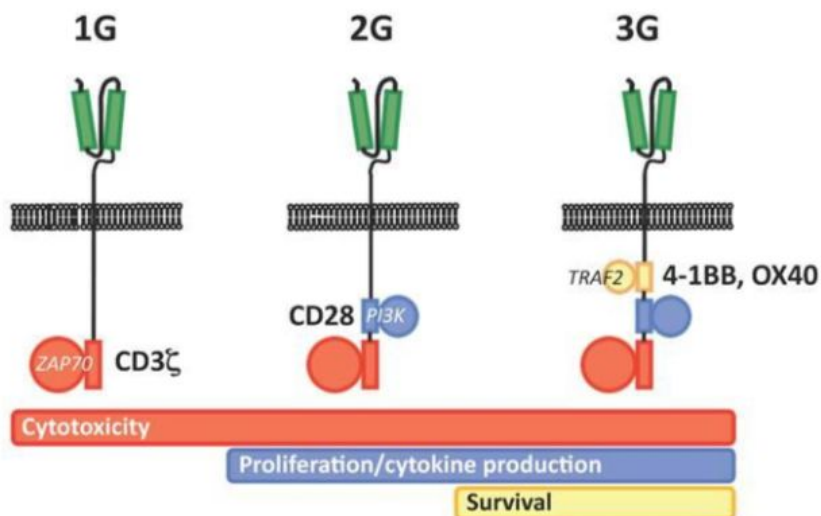
2- Génération 2

On a mis en plus des co activateur comme CD28 , PI3 kinase : des éléments du signal 2. Là on a gardé une bonne cytotoxicité , avec une prolifération plus efficace de cytokines. Mais ces lymphocytes de deuxième génération ne survivent pas assez longtemps chez les patients après injection.

3- Génération 3

On rajoute des éléments du signal 3 comme TRAF2 (le facteur de TNF alpha), on a alors amélioré tous les paramètres avec toutes les fonctionnalités des LT.

Maintenant nous avons une quatrième génération avec la production de cytokines et des enzymes de destruction de façon plus efficace.



C- Application clinique : protocole des CAR-T

1 - Prélèvement des LT chez les patients à partir du sang. D'abord par centrifugation pour purifier les cellules (différencier les globules rouges des leucocytes). Puis on effectue une cytométrie en flux grâce aux marqueurs de surface CD3 en utilisant un antigène anti CD3.

2 - On peut faire proliférer les LT mais ils faut les transformer pour qu'ils expriment les récepteurs chimérique. On le fait par un vecteur viral qui est le plus efficace pour transfecter le gène que l'on souhaite. Ici celui du récepteur chimérique. Après transfection les cellules vont commencer à exprimer en surface le récepteur chimérique.

3 - Une fois transfectées , on place les CAR-T cells dans des bioréacteurs pour les faire multiplier jusqu'à atteindre 10 millions/ mL. Il faut entre 10 à 14 jours pour faire l'opération entière.

4 - Réinjection chez les mêmes patients des CAR-T cells. Il s'agit d'une greffe cellulaire ou plus précisément d'une autogreffe. En effet les cellules des patients sont prélevées, modifiées et réinjectées. Il y a très peu de problème de rejet.

III - Procédure de mise en place - essais clinique :

A - Premier succès de CAR-T cells

Le premier succès avec cette technologie CAR-T est chez une jeune patiente diagnostiquée précocement , par une forme de leucémie lymphoblastique aiguë (LLA) un lymphomes de type B. Cette forme est la plus agressive de leucémie. Les protocoles classique avec de la chimiothérapie et même une transplantation de moelle osseuse n'ont pas fonctionné.

Ils ont finalement opté pour une option expérimentale qui est l'immunothérapie CAR-T (UCART19) en 2015, après quelques semaines de traitement , il y a eu une disparition complète de tous les LB anormaux. Plus aucune cellule tumorale.

On parle de "gene editing", thérapie cellulaire car on utilise des cellules dont le génome a été modifié.

B-La Technologie TALEN (transcription activator-like effector nucleases)

Conçu par Cellectis, il s'agit du premier essai dans lequel on fait de l'éditions génétiques chez l'Homme. Cette technique consiste à utiliser des nucléases qui sont des enzymes de restrictions artificielles créées par fusion d'un domaine de liaison à l'ADN, nous avons donc un domaine protéique qui interagit avec une séquence spécifique au niveau de l'ADN.

Ce domaine est couplé à une nucléase qui va couper seulement à ce niveau de l'ADN.

On va combiner le domaine TALE avec le domaine nucléase et ainsi créer des enzymes de restriction spécifique pour éditer n'importe quelle séquence de l'ADN.

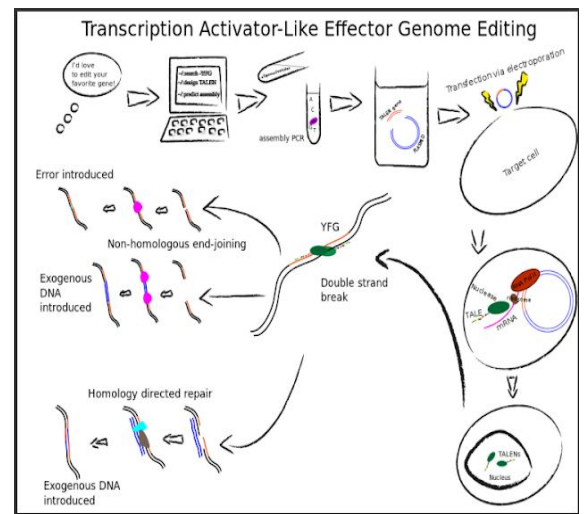
Talen peut être utilisé pour faire des modifications du génome grâce à la capacité d'induire des cassures doubles brins. Pour réparer ces cassures il y a deux possibilités :

- Réparations par jonctions des extrémités non homologues permet de reconnecter deux extrémités d'ADN, et peut créer des mutations
- Réparation par recombinaison homologue, elle peut permettre l'introduction d'ADN étranger complémentaire au site de cassure, de cette manière là on est capable d'introduire de nouveaux gènes.

Globalement l'une ou l'autre stratégie permet de modifier l'ADN soit en créant des mutations soit en apportant un gène (thérapeutique ou celui que l'on veut) au niveau de l'ADN

Procédure :

On va étudier la région de l'ADN qu'il faut viser en fonction de cette séquence nucléotidique on va concevoir une séquence TALE spécifique, on va fusionner la séquence qui va coder pour le nucléase et obtenir le gène TALEN qu'on va introduire dans un plasmide. On transfecte la cellule cible (via électroporation par exemple), une fois transfecté le gène qui se trouve dans le plasmide va être transcrit et traduit pour produire le complexe TALEN. Les nucléases vont interagir avec une séquence spécifique de l'ADN et couper cette adn double brin, des erreurs vont être introduites (mutations) sauf si on a de l'ADN exogène que l'on va pouvoir introduire grâce à la réparation par recombinaison homologue.



C- CRISPR-CAS9

1- Emmanuelle Charpentier

Le prix nobel de cette année a été attribué à deux chercheuses une française et une Américaine qui ont collaborés pour découvrir CRISPR-CAS9 (technique de ciseau génétique qu'on mit en évidence en 2012, Le professeur Emmanuelle Charpentier a créé et dirige l'institut Max Planck de Science des Pathogènes à Berlin.

Elle est également professeur à l'Université d'Umea en Suède et professeur honoraire à l'Université Humboldt. Membre de l'Académie des sciences et de l'Académie des technologies en France, elle est un exemple de l'excellence de la formation à la française (master de Sorbonne Université, puis doctorat et post-doctorat à l'Institut Pasteur) puis d'un parcours international au sein d'institutions américaines prestigieuses avant un retour en Suède et en Allemagne.

Remarque: c'est la première fois que l'on attribue un prix nobel à deux femmes

2- La technique

Elle va révolutionner le domaine de l'ingénierie génétique grâce aux travaux d'Emmanuelle Charpentier, nous avons pu comprendre certains mécanismes de défense du système immunitaire chez la bactérie, un système qui va être utilisé pour éliminer le génome des virus. CRISPR-CAS9 permet d'inactiver un gène de contrôler ou modifier son expression.

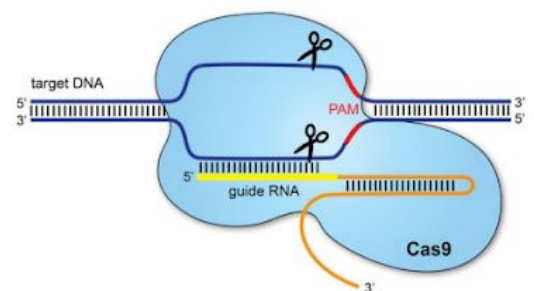
De cette manière là on a pu ouvrir les perspectives pour comprendre les mécanismes moléculaires au niveau de la cellule mais aussi pour élaborer de nouvelles approches thérapeutiques grâce à ces connaissances de fonctionnement cellulaire.

Cette technique représente un espoir formidable pour traiter des maladies héréditaires monogéniques elle permet aussi grâce à ces modifications précises au niveau du génome de connaître le fonctionnement de beaucoup de gènes et de beaucoup de systèmes de contrôle au niveau de la cellule. Parmi ces applications, l'élaboration du CAR T vise à faire exprimer par la cellule un récepteur chimérique mais aussi d'inactiver certains gènes pour améliorer la survie et contrôler ce système de CAR T

De Talen à CRISPR nous avons un système beaucoup plus simple et moins cher pour étudier le génome, la précision reste problématique. Nous avons grâce à cet outil CRISPR CAS 9 un système de nucléase plus spécifique

Nous avons besoin dans ce système d'un ARN que l'on appelle guide qui peut cibler n'importe quelle séquence complémentaire d'ADN et non pas des modifications de la protéine elle-même

Ici nous avons le complexe CRISPR/CAS9. CAS9 c'est la nucléase qui va couper toutes les séquences complémentaires de l'ARN guide mais elle va être ciblée grâce à ce guide d'ARN qui interagit avec sa séquence complémentaire au niveau de l'ADN ce qui va permettre à la CAS9 de couper à cet endroit spécifique donc pour viser n'importe quelle région de l'ADN il suffit d'avoir la région complémentaire au niveau de cet ARN guide. Grâce à son



efficacité, sa rapidité et son faible coût CRISPR CAS9 devient un outil de premier plan dans le domaine de génie génétique et de thérapie génique.

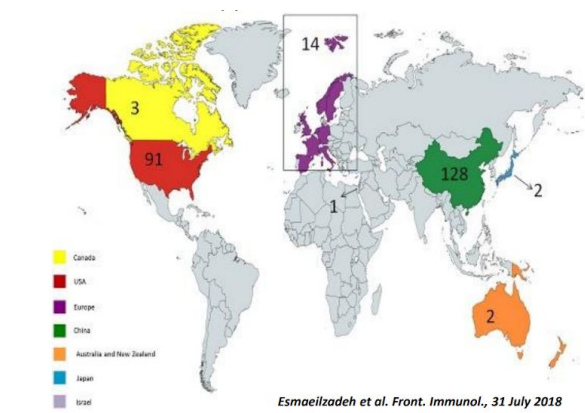
3- CRISP edit

C'est une plateforme qui va nous proposer d'utiliser CRISPR-CAS9 pour faire les modifications que l'on veut, on collabore avec cette plateforme à bdx qui offre des prestations de services aux équipes bordelaises mais aussi partout en France.

Il s'agit maintenant de l'outil le plus répandu pour éditer le génome et pour faire des thérapies géniques et cellulaires

“CRISPR Cas9 genome editing induces megabase-scale chromosomal traductions”. On peut viser des régions spécifiques de l'adn mais cette technique peut entraîner des pertes et des coupures mégabases (plusieurs millions de bases) qui ne sont pas spécifiques.

On a encore beaucoup à apprendre avant de commencer à faire de la thérapie génique et cellulaire chez l'Homme. L'équipe a mis en évidence ces coupures au niveau du chromosome et a proposé une manière pour minimiser et éviter ces effets secondaires. Des travaux sont en cours pour avoir des techniques plus performantes et plus sécurisé.



Là on peut voir les essais cliniques à travers le monde.

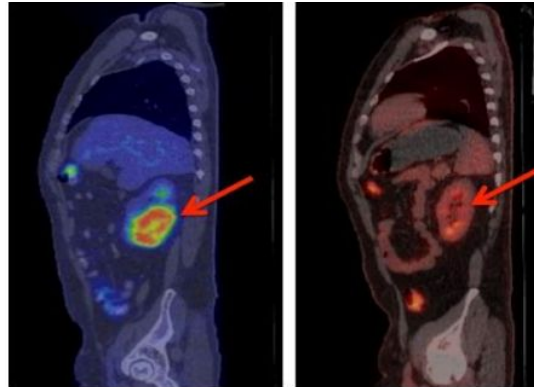
On a beaucoup d'études cliniques en Chine car il y a un co-inventeur de CRISPR-Cas9 (un chercheur Chinois qui n'a pas eu de prix nobel) qui profite d'utiliser cette technologie d'où tous ces essais cliniques en Chine.

IV Effets secondaires et suivi clinique

A-Essai clinique

Lors d'un essai clinique incluant 29 patients atteints du forme mortel d'une leucémie aiguë lymphoblastique, on leur a fait subir la procédure de CAR T, on a récupéré leurs cellules immunitaires que l'on a modifié, édité et réinjecté chez les patients. Sur les 29, 27

ont été guéri (90%). La procédure a été aussi efficace pour certains autres types de lymphomes chroniques.



Ici nous avons une photo de scan tomographique par émission de positons (PET scan). C'est une technique d'imagerie dans laquelle on injecte des traceurs métaboliques souvent de faible radioactivité comme le glucose qui se fixe en général sur tous les organes mais dans le cas du cancer nous avons une activité beaucoup plus importante que dans le reste des cellules de cette manière là les cellules tumorales vont utilisés beaucoup plus de glucose radioactif donc on va pouvoir localiser cette suractivité de glycolyse au niveau de cellule tumorale. On peut voir ici avant le traitement cette masse tumorale au niveau des reins. 2 mois après le traitements cette masse tumorales a complètement disparu.

B - Les effets secondaires

Nous avons pu guérir 90% des patients de l'essai clinique mais deux patients sont morts, beaucoup de patients ont développé une inflammation systémique on appelle ça "tempête cytokinique" (cytokine release syndrome). Comme on a injecté des super lymphocytes T les réponses de réactions immunitaires étaient trop forte, ça a déclenché une inflammation systémique. Cette Tempête cytokinique a induit une toxicité au niveau de beaucoup d'organes, du système neuronale, du coeur, des poumons (complications respiratoire). Lors de l'essai, 2 patients sont morts d'œdème au niveau du cerveau.

Remarque: Il ne faut pas oublier que l'on a à faire à des patients en stade terminale.

1- Est ce qu'on peut minimiser ces effets cliniques secondaire?

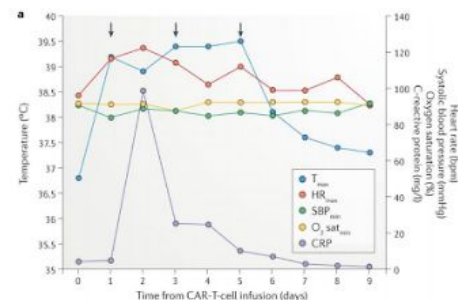
Quand on regarde de près ce qui se passe dans ce syndrome de libération de cytokine (qui est le problème le plus répandu), on a découvert que la plupart des patients qui présentent ces syndromes ont des niveaux élevés de d'interleukines 6. On a un marqueur sanguins, heureusement on a déjà 2 médicaments qui agissent sur cette voie de

l'interleukine 6 qu'on utilise pour traiter l'arthrite juvénile, etanercept et tocilizumab qui vise soit la molécule soit le récepteur de l'interleukine 6.

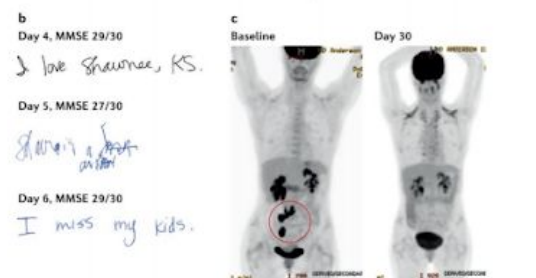
On peut justement penser à utiliser ces médicaments pour éviter des effets secondaires lors des syndromes grâce à l'utilisation de ces médicaments les effets secondaires sont minimisés. C'est aussi grâce à ces médicaments on peut remédier à ce syndrome cytokinique sans toucher la proliférations des CAR T thérapeutique

Remarque : le coût d'une thérapie est autour de 300 à 400 milles euros pour un traitement.

Ici nous avons un cas clinique de patiente traité par CAR T que nous avons suivie pendant 9 jours. Les flèches correspondent à l'injection de tocilizumab qui ont été fait pour traiter les effets secondaires. Le CRP est le facteur inflammatoire dans le sang on peut voir un pic 2 jours après l'injection. on peut voir aussi qu'on a pu contrôler ce syndrome cytokinique après trois injection de tocilizumab (on voit la fièvre qui retombe après la troisième injection).



Sur ce document on peut l'état neurologique de la patiente. Aux jours 4,5 et 6 on fait une évaluation MMSE (score d'évaluation neurologique /30). On remarque au 5ème jour une manifestation de neurotoxicité car on perd 2 points sur le test MMSE que l'on récupère le jour suivant. Nous avons aussi un TEP scan où l'on peut voir qu'après un mois la masse tumorale ganglionnaire a complètement disparu.



2- Classification de ces effets secondaires

Depuis très peu de temps on a commencé à classer ces effets secondaires et parler de niveau de syndrome. Il existe 4 niveaux avec plusieurs critères comme la température ou la pression systolique et pour chaque niveau des techniciens se sont réunis pour proposer des niveaux d'intervention afin d'adapter la réponse thérapeutique aux effets secondaires. Cela permet un suivi cas par cas.

Symptom or sign of CRS	CRS grade 1 ^a	CRS grade 2 ^b	CRS grade 3 ^b	CRS grade 4 ^b
Vital signs				
Temperature $\geq 38^{\circ}\text{C}$ (fever)	Yes	Any	Any	Any
Systolic blood pressure < 90 mmHg (hypotension)	No	Responds to IV fluids or low-dose vasopressors	Needs high-dose or multiple vasopressors ^b	Life-threatening
Needing oxygen for $\text{SaO}_2 > 90\%$ (hypoxia)	No	$\text{FiO}_2 < 40\%$	$\text{FiO}_2 \geq 40\%$	Needing ventilator support
Organ toxicities^b				
<ul style="list-style-type: none"> * Cardiac: tachycardia, arrhythmias, heart block, low ejection fraction * Respiratory: tachypnoea, pleural effusion, pulmonary oedema * GI: nausea, vomiting, diarrhoea * Hepatic: increased serum ALT, AST, or bilirubin levels * Renal: acute kidney injury (increased serum creatinine levels), decreased urine output * Dermatological: rash (less common) * Coagulopathy: disseminated intravascular coagulation (less common) 	Grade 1	Grade 2	Grade 3 or grade 4 transaminitis	Grade 4 except grade 4 transaminitis

V Amélioration et futures génération de CAR-T

A - Résistance au traitement

Après par la suite on trouve que certains patients ne répondent pas à ce traitement, on vise l'antigène CD19 si les cellules ne l'expriment pas ou très peu elles vont être résistante. La résistance provient donc de la perte de l'antigène de surface. La stratégie pour palier à cela est donc de viser un autre marqueur par exemple CD22. On va donc utiliser le CAR T CD22 chez les patients en rechute.

Remarque: CD19dim quand l'expression de CD19 est faible et de CD19- quand celle-ci ne l'exprime plus du tout.

B - Essai clinique de phase 1

Dans cette essai on a pris 21 patients, enfants et adultes. Cette essai a pu soigné 11/15 patients ayant reçu une dose $> 1 \times 10^6$ CD22 CAR-T cellules/kg avec 5 patients étant CD19dim ou CD19-. Mais là aussi il y a des rechutes associées à des pertes de CD22.

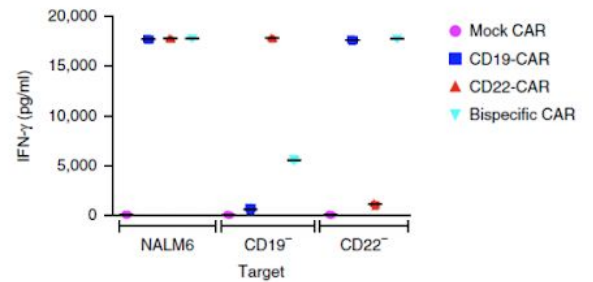
On va donc utiliser la technologie CAR T bi spécifique qui consiste à viser 2 types de marqueurs CD19 et CD22.

C - Technologie CAR-T bi spécifique

On utilise pour vérifier l'efficacité du système différentes cellules tumorales certaines expriment CD19 et CD22 d'autre que CD19 et d'autre que CD22.

Le marqueur que l'on suit c'est IFN- γ (si il s'exprime cela veut dire que le CAR T que l'on utilise est efficace).

On remarque que dans la lignée qui expriment tout les CD que tous les CAR-T marchent sauf le Mock (témoin négatif). Pour les cellules qui n'expriment pas CD19 le CAR-T CD19 ne fonctionne pas alors que le CD22 et le bi spécifique eux fonctionnent et inversement pour les cellules qui n'expriment pas CD22 (le CAR-T CD22 ne fonctionne pas alors que CD19 et le bispécifique fonctionnent). Donc pour tuer une cellule tumorale il faut utiliser un CAR-T qui vise un récepteur qui est exprimé par les cellules.



Expérimentalement chez la souris on a injecté des tumeurs et par luminescence on a pu suivre au cours du temps l'évolution des cellules tumorales. On peut voir que pour CD19 il y a eu quelques rechutes dû probablement à une résistances alors que pour CD22 et le bi spécifique le traitement a été efficace.

