



HAL
open science

Mécanismes de résistance aux CAR-T cells dans les leucémies aiguës lymphoblastiques B : revue de la littérature et description d'un cas

Tracy Rabilloud

► To cite this version:

Tracy Rabilloud. Mécanismes de résistance aux CAR-T cells dans les leucémies aiguës lymphoblastiques B : revue de la littérature et description d'un cas. Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-02956079

HAL Id: dumas-02956079

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02956079>

Submitted on 2 Oct 2020

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.

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le 25 Septembre 2020

Par Mme RABILLOUD Tracy

Née le 18 Janvier 1992

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76
du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

TITRE :

**MÉCANISMES DE RÉSISTANCE AUX CAR-T CELLS
DANS LES LEUCÉMIES AIGUËS LYMPHOBLASTIQUES B :
REVUE DE LA LITTÉRATURE ET DESCRIPTION D'UN CAS.**

----oOo----

JURY :

Président : Mme le Professeur Laurence CAMOIN
Membres : M. le Professeur Pierre-Emmanuel MORANGE
Mme le Docteur Marie LOOSVELD
Mme le Docteur Dominique PAYET-BORNET

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le 25 Septembre 2020

Par Mme RABILLOUD Tracy

Née le 18 Janvier 1992

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76
du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

TITRE :

**MÉCANISMES DE RÉSISTANCE AUX CAR-T CELLS
DANS LES LEUCÉMIES AIGÜES LYMPHOBLASTIQUES B :
REVUE DE LA LITTÉRATURE ET DESCRIPTION D'UN CAS.**

----oOo----

JURY :

Président : Mme le Professeur Laurence CAMOIN
Membres : M. le Professeur Pierre-Emmanuel MORANGE
Mme le Docteur Marie LOOSVELD
Mme le Docteur Dominique PAYET-BORNET



27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05

Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Jean-Pierre REYNIER, M. Henri PORTUGAL
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Florence GAUREL
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Aurélie BELENGUER
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Nathalie BESNARD

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE

M. Vincent PEYROT
M. Hervé KOVACIC

GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE

M. Christophe DUBOIS

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE

M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE	M. Robert GILLI Mme Odile RIMET-GASPARINI Mme Pascale BARBIER M. François DEVRED Mme Manon CARRE M. Gilles BREUZARD Mme Alessandra PAGANO
GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE	M. Eric SEREE-PACHA Mme Véronique REY-BOURGAREL
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Pascal PRINDERRE M. Emmanuel CAUTURE Mme Véronique ANDRIEU Mme Marie-Pierre SAVELLI
NUTRITION ET DIETETIQUE	M. Léopold TCHIAKPE

A.H.U.

CULTURE ET THERAPIE CELLULAIRE	M. Jérémy MAGALON
--------------------------------	-------------------

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS	Mme Angelique GOODWIN
---------	-----------------------

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

PROFESSEURS

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

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI
M. Thierry AUGIER
M. Edouard LAMY
Mme Alexandrine BERTAUD
Mme Claire CERINI
Mme Edwige TELLIER
M. Stéphane POITEVIN

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Aurélie LEROYER
M. Romaric LACROIX
Mme Sylvie COINTE

MICROBIOLOGIE

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE

Mme Michèle LAGET
M. Michel DE MEO
Mme Anne DAVIN-REGLI
Mme Véronique ROUX
M. Fadi BITTAR
Mme Isabelle PAGNIER
Mme Sophie EDOUARD
M. Seydina Mouhamadou
Mme Carole DI GIORGIO
M. Aurélien DUMETRE
Mme Magali CASANOVA
Mme Anita COHEN

BIOLOGIE CELLULAIRE

Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

M. Maxime LOYENS

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Catherine BADENS

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. Philippe GALLICE

CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE –
CHIMIE THERAPEUTIQUE

M. Pascal RATHELOT
M. Maxime CROZET

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE

M. Patrice VANELLE
M. Thierry TERME

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE

Mme Evelyne OLLIVIER

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

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

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Cyril PUJOL
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

A.H.U.

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Mathieu CERINO
--	-------------------

ATER

CHIMIE ANALYTIQUE	M. Charles DESMARCHELIER
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Fanny MATHIAS

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	Mme Diane BRAGUER M. Stéphane HONORE
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Bruno LACARELLE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT	Mme Frédérique GRIMALDI

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Joseph CICCOLINI Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.

PHARMACIE CLINIQUE	M. Florian CORREARD
PHARMACOCINETIQUE	Mme Nadège NEANT

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire

Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie

Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché

Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Joel VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 22 février 2018

*« L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation
aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être
considérées comme propres à leurs auteurs. »*

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury,

Mme le Professeur Laurence CAMOIN,

Merci de me faire l'honneur de présider ce jury. Je vous remercie de m'avoir communiqué vos connaissances et votre passion pour l'Hématologie, et ce dès mes premières années de faculté. Merci pour votre soutien et votre confiance lors du concours de l'internat. Soyez assurée de ma sincère reconnaissance et de ma profonde estime.

Mr le Professeur Pierre-Emmanuel MORANGE,

Pour me faire l'honneur de faire partie de ce jury. Je vous remercie pour l'opportunité que vous m'offrez en restant dans votre service pour les deux prochaines années. Je vous prie de trouver ici l'expression de mon respect et de ma sincère reconnaissance.

Mme le Docteur Marie LOOSVELD,

Je te remercie d'avoir dirigé ce travail. Merci pour la confiance que tu m'as accordée et pour les heures que tu as consacrées à superviser cette thèse. Merci pour ta disponibilité et ton encadrement ces deux dernières années, pour ton écoute et tes conseils bienveillants. Ta compétence m'inspire le plus grand respect et je suis heureuse de pouvoir continuer à travailler et apprendre à tes côtés.

Mme le Docteur Dominique PAYET-BORNET,

Je te remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury, et d'avoir également encadré ce travail. Cette thèse et cet article n'auraient pas vu le jour sans toutes tes idées ! Merci pour ton énergie, ta bonne humeur, ton entrain, ta disponibilité et ton désir de transmettre tes connaissances. Ce fut un véritable plaisir de travailler avec toi.

A ma famille,

A mes parents,

Pour votre soutien infaillible depuis toutes ces années. Si j'en suis arrivée ici aujourd'hui c'est grâce à vous, à votre amour, à vos encouragements, à votre soutien, à votre présence. Merci pour les valeurs que vous m'avez transmises, merci d'avoir été et d'être toujours là, merci pour les innombrables allers-retours Gap-Marseille. Merci Maman pour tous ces bons petits plats qui me redonnent de la force (et des kilos !) pendant mes périodes de stress. Merci Papa pour toutes ces heures passées à réfléchir et à imprimer mes plannings de révision durant toutes mes années Fac'. Promis maintenant c'est fini !! Je mesure chaque jour la chance que j'ai de vous avoir à mes côtés. Je devrai vous le dire plus souvent, je vous aime.

A mes grands-parents,

Partis bien trop tôt. J'espère vous rendre fière de là-haut.

A l'ensemble de ma famille pour tous les bons moments partagés.

A mes amis,

A Lise,

Ma préférence, ma Lyze de nyyy, mon opossum, frère, bref ma meilleure amie. Plus de 20 ans d'amitié et tu es toujours là. Il y en aurait des choses à dire et des anecdotes à raconter ! Tu m'as fait le plus beau des cadeaux, celui d'être témoin de ton mariage. Je te souhaite tout le bonheur du monde dans ta vie de femme, d'épouse et de maman. Sache que mon amitié est éternelle.

A ta maman, Martine,

Qui m'a vu grandir et qui me fait le plaisir d'être là aujourd'hui. Quand est-ce que tu me fais partager une de tes supers randonnées ?

A Brigitte et Philippe,

Pour ces samedis d'enfance passés chez vous avec Alexis, pour les pizzas de Mr Para, pour votre soutien et vos encouragements. Merci d'être présents aujourd'hui.

A mes amis de la Fac,

A mes gazelles,

Ma Romero, ma Romrom. Pour cette amitié solide que l'on a créée depuis notre 2^{ème} année de Pharma. Pour ces fous rires, ton manque de filtre, nos programmes d'hyper actives, notre danse de soirée, nos dodos alcoolisés, nos voyages et nos péripéties sous les « micro-climats »... Je te souhaite le meilleur pour cette nouvelle étape sous les tropiques, sois sûre que mes prochaines vacances se feront chez toi !!

Ma Sereni, la seule, l'unique. Dès nos premiers TP le courant est passé, toujours là pour faire la pitre ! S'en est suivi une multitude de bons moments, de fous rires, de complicité, de soirées. The legend id back bb ! A notre amitié depuis toutes ces années.

Aux garçons,

Thomas, pour ces semestres d'internat partagés, pour nos sessions escalade et footing (à reprendre très vite !) et ces petits verres en afterwork. Vincent, pour ton franc-parler légendaire, ton sens de la répartie, pour tes conseils toujours avisés, pour ton amitié. Robin, pour tes entourloupes que toi seul as le secret. Armel, pour ces sessions grimpe, ta motivation et ton rire qui en dit long. Thibaut, pour ta bonne humeur et ton enthousiasme à toute épreuve. JB, toujours le mot pour rire.

A Pauline, pour tous ces bons moments partagés. Je vous souhaite, à Martin et toi, tout le meilleur dans cette nouvelle étape de votre vie.

Aux pépettes, Laurie, Maëlle, Aurélie, Alexia, Camille, Myriam, Elodie, pour ces belles années pharma.

A mes amis de l'internat,

A Estelle, ma Bantouille. Merci pour ces semestres passés ensemble, pour ta présence au quotidien, ta franchise et tes bons conseils. A nos vacances au ski qui deviennent habituelles, à celles à la Réunion où j'ai cru te perdre, à la Corse et à la côte Basque. A cette complicité et à cette amitié solides créées depuis plusieurs années.

A Clara, ma chouchou. Pour toutes nos discussions et ces heures d'appels et de notes vocales échangés, pour ta douceur et ta gentillesse, pour tous ces petits défis sportifs partagés, et toutes ces belles aventures qui nous attendent encore.

A Marie, ma Sappou. Pour ta joie de vivre, pour toutes ces photos dossiers qui nous font rire à en pleurer, pour nos sessions shopping, pour ton EVJF et ton mariage qui resteront des moments inoubliables. Je te souhaite le meilleur pour ta nouvelle vie à la montagne, sois prête à nous voir arriver très vite sur les pistes !!

A Céline, ma Bosch'. Pour nos têtes de 3h du mat', pour ces cours de M2 passés ensemble et ces galères qui en ont suivies, pour nos traditionnels « tu t'habilles comment ? », pour nos débriefs après chaque série Netflix, pour ces vacances à Biarritz.

A Julie, Juju. Mon amie Capricorne (ceci n'excuse pas tout !!), pour toutes ces heures à pester, pour tes messages parfois trop succincts, pour notre stress trop communicatif, pour m'apprendre les chromosomes, pour ces vacances en Corse et celles à Biarritz.

A Charline, pour ta présence et ta patience à m'entendre répéter des heures les mêmes choses, pour ces soirées du vendredi, pour être une dose d'amour et de câlins.

A Loïc, pour le plaisir de t'avoir retrouvé, pour tous ces fous rires et ta joie de vivre, pour toutes nos discussions et tes bons conseils, pour tes chorégraphies dont toi seul as le secret.

A Emma, ma future co-assistante. Pour ton franc parler qui me fait bien rire, pour nos vacances à Biarritz, pour le plaisir que j'ai à travailler à tes côtés. Et aussi un énorme merci, et pas des moindres, pour être une des rares personnes à avoir lu ce manuscrit !!

A Maude, pour ta gentillesse, ton humour et tes idées farfelues ! A nos vacances en Corse et à celles à Biarritz.

A Ségolène, pour ta gentillesse et ta douceur, pour nos vacances en Corse, nos soirées à votre coloc' et pour tous nos moments partagés.

A Paul. Ami à l'école primaire malgré quelques petites anecdotes, je suis heureuse de t'avoir retrouvé ces dernières années ! Merci pour tous ces moments, pour ces soirées au Pointu, pour ton enthousiasme à toute épreuve, pour ta joie de vivre.

A Jordan, mon co-interne de Viro. Merci pour ce semestre passé à tes côtés qui nous aura permis de tisser de jolis liens d'amitié. C'est toujours un plaisir de se retrouver autour d'un verre et de quelques tapas !

A Noémie, pour être ce petit bout de femme si attachante et pétillante. Hâte de te retrouver en Novembre !!

A Shirley, pour ce semestre passé ensemble et pour tous les moments qui ont suivis. A quand une sortie grimpe ou running ?

A Pauline, pour animer nos soirées avec une playlist old school qu'on adore !!

A Charlotte, pour ce semestre à l'IPC, pour nos sessions squash et pour ces bons moments partagés.

A Marc, le 100 de la place Castellane !!

A Florence, pour le petit bout d'île de Beauté que tu nous ramènes et ton sens unique de la répartie, toujours le mot pour rire !

A Nico, pour ta gentillesse, pour ces bons moments partagés.

A Maxime et Lorène, pour nos semestres partagés en Viro et à Aix.

A Maxime, pour toutes tes connaissances transmises en Hémato, pour ta pédagogie, pour nos soirées au Pointu.

A Marion, ma binôme d'escalade et de toutes sortes d'aventures. Merci pour ces afterworks en falaise, pour ton dynamisme et ta motivation à tester de nouvelles activités. On s'est quand même bien trouvées !!

A toute l'équipe du laboratoire d'Hématologie de la Timone,

A Vanessa, Isabelle, Caroline, Suzy. Je vous remercie pour les connaissances et les conseils que vous m'avez apportés. C'est un plaisir de continuer avec vous.

A mes collègues hémostasiens Manal et Pierre, avec qui j'ai la chance de travailler au quotidien.

A mes co-internes actuels, Cécilia et Norman, qui ont abattu un grand nombre de lames pour me permettre de me consacrer à l'écriture de cette thèse ; et aux hémostasiens, Maëlle, Yahya et Samuel. Ce fut un plaisir de partager ces cinq derniers mois à vos côtés.

A tous les techniciens du laboratoire. Et un merci tout particulier à Brigitte, pour ton écoute, ta gentillesse, tes bons conseils et tous nos potins (même si je t'en veux un peu d'être partie si tôt !) ; à Solène, Céline, Marie et Elena, à nos discussions et ces petits apéros qui rendent le début des gardes moins difficile !

A l'équipe du CIML,

A Delphine pour toute la partie bio-informatique, pour ton temps et tes explications imagées, m'aidant à y voir plus clair.

A Laurine, pour ta formation 10XGenomics, pour tes conseils et ta patience lors de mes moments de panique.

A Mathis, pour le plaisir que j'ai eu à travailler avec toi, je te souhaite le meilleur pour l'avenir.

A Saran, pour tes compétences en bio-informatique.

A tous les membres de l'équipe « Instabilité Génomique et Hémopathies Humaines » avec qui j'ai pris plaisir à travailler et à partager ces moments avec vous.

Et enfin, merci à tous ceux que je n'ai pas cités, aux anciennes équipes, anciens labos, anciens co-internes. Merci à ceux qui ont fait ou font partie de ma vie.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	1
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	3
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES	4
INTRODUCTION	6
PREMIÈRE PARTIE : Les CAR-T cells dans les leucémies aiguës lymphoblastiques B de l'enfant et de l'adulte jeune : une thérapie innovante et prometteuse	8
I. Les CAR-T cells : biologie, concepts et principes.....	8
I.1. Généralités : activation lymphocytaire T	8
I.2. Structure des CAR-T cells	9
I.3. Évolution des cellules CAR-T	10
I.3.1. CAR-T cells de 1 ^{ère} génération	11
I.3.2. CAR-T cells de 2 ^{ème} génération	11
I.3.3. CAR-T cells de 3 ^{ème} génération	12
I.3.4. CAR-T cells de 4 ^{ème} génération	12
I.4. Modes de production des CAR-T cells et sources cellulaires.....	13
I.4.1. CAR-T cells autologues	13
I.4.1.1. Leucaphérèse.....	14
I.4.1.2. Méthodes de transduction du CAR dans les lymphocytes	14
I.4.1.2.1. Stratégies virales.....	15
I.4.1.2.2. Stratégies non virales.....	15
I.4.1.3. Culture ex-vivo et expansion des lymphocytes	16
I.4.2. CAR-T cells allogéniques	17
I.5. Sélection de la cible du CAR dans les LAL-B.....	18
II. Les CAR-T cells dans les leucémies aiguës lymphoblastiques B (LAL-B).....	20
II.1. Généralités sur la pathologie.....	20
II.1.1. Définition	20
II.1.2. Incidence	20
II.1.3. Classification des LAL-B.....	21
II.1.3.1. Classification EGIL.....	21
II.1.3.2. Classification OMS 2016	21
II.1.4. Prise en charge thérapeutique des LAL-B	22
II.1.4.1. Première ligne de traitement	22
II.1.4.2. Première rechute.....	24
II.1.4.3. Rechutes ultérieures et maladie réfractaire	24
II.2. Place actuelle des CAR-T cells dans l'arsenal thérapeutique des LAL-B	25
II.3. Résultats d'essais cliniques et d'études pilotes des CAR-T cells dans les LAL-B.....	26
II.3.1. NCI NCT01593696 : Étude de dose de phase I.....	26
II.3.2. ELIANA NCT02435849 : Étude pivot de phase II non comparative10.....	27
II.3.3. Étude supportive non comparative (ENSIGN)	28
II.3.4. Seattle NCT020284511	28
II.3.5. MSKCC NCT01860937.....	29

II.3.6. Essais cliniques en cours.....	31
II.3.6.1. CASSIOPEIA CCTL019G2201J : Essai de phase II	31
II.3.6.2. OBERON CCTL019I2301 : Essai de phase III.....	31
II.4.Perspectives de l'utilisation des CAR-T cells dans l'arsenal thérapeutique des LAL-B	31
II.5.Toxicité rapportée chez l'enfant et le jeune adulte	32
II.6.Mécanismes d'échappement au traitement par CAR-T cells anti-CD19	33
II.6.1. Les rechutes CD19-positives	34
II.6.1.1. Domaine de co-stimulation du CAR.....	34
II.6.1.2. Origine du fragment variable du CAR	35
II.6.1.3. Le phénotype de départ des cellules T des patients.....	35
II.6.2. Les rechutes CD19-négatives.....	36
II.6.2.1. Mutation du gène CD19	37
II.6.2.2. Sélection de clones CD19-négatifs par pression immunitaire.....	39
II.6.2.3. Switch de lignée de la LAL en LAM	40
II.6.2.4. Trogocytose : lyse fratricide et exhaustion des cellules CAR-T	41
II.6.2.5. Cas unique d'une résistance causée par la transduction d'une cellule B leucémique	41
OBJECTIF DU TRAVAIL	43
DEUXIÈME PARTIE : Mise en place de l'approche CITE-Seq	44
I. Protocole de couplage des anticorps avec leur code-barre oligonucléotide	44
I.1. Oligonucléotides, anticorps et produits chimiques	44
I.2. Conjugaison anticorps-oligonucléotide.....	45
I.2.1. Couplage oligonucléotide & TCO	45
I.2.2. Couplage AC & Mtz	45
I.2.3. Conjugaison AC & oligonucléotide.....	45
I.2.4. Vérification de la fonctionnalité des AC-BC par FACS.....	46
I.3. Protocole CITE-Seq	47
I.3.1. Préparation des échantillons.....	47
I.3.2. Construction des librairies.	47
I.3.3. Contrôle qualité des librairies.	48
I.3.4. Séquençage.....	48
TROISIÈME PARTIE : Article en révision dans Nature Communications	50
DISCUSSION	66
CONCLUSION	71
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	72

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AC :	Anticorps
AC-BC :	Anticorps conjugué à un code-barre oligonucléotide
AMM :	Autorisation de Mise sur le Marché
BC :	Code-barre oligonucléotide
CAALL :	Protocole de traitement de la leucémie aiguë lymphoblastique de l'enfant et de l'adolescent
CAR :	Chimeric Antigen Receptor
CART-19 :	CAR-T cells anti-CD19
CD :	Cluster de Différenciation
CITE-seq :	Cellular Indexing of Transcriptomes and Epitopes by Sequencing
CMH :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA :	Cellule Présentatrice d'Antigène
CRISPR :	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat
EFS :	Survie sans évènement
EGIL :	European Group for the Immunological Characterization of Leukemias
FACS :	Fluorescence-Assisted Cell Sorting
GCSH :	Greffe de Cellules Souches Hématopoïétiques
HAS :	Haute Autorité de Santé
HTO :	Hashtag oligos
LAL :	Leucémie aiguë lymphoblastique
LAL-B R/R :	Leucémie aiguë lymphoblastique B récidivante et/ou réfractaire
LAM :	Leucémie aiguë myéloïde
MRD :	Maladie Résiduelle Détectable
MTI :	Médicaments de Thérapie Innovante
MTZ :	Méthyltétrazine
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
OS :	Survie globale
PBMC :	Cellules mononucléées du sang périphérique
Phénotype Tem :	Phénotype T effecteur mémoire
Phénotype Tet :	Phénotype T effecteur terminal
Phénotype Tcm :	Phénotype T central mémoire
Phénotype Tn :	Phénotype T naïf
RC :	Rémission Complète
RCi :	Rémission Complète avec récupération hématologique incomplète
RT-PCR :	Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
scRNA-seq :	single-cell RNA sequencing
scFv :	single-chain variable fragment
Single-cell :	Approche à l'échelle de la cellule unique
SRC :	Syndrome de Relargage Cytokinique
SSC :	Side Scatter
TALEN :	Transcription Activator Like Effector Nucleases
TCO :	Transcyclooctène
TCR :	Récepteur des cellules T
TRUCKs :	T cells Redirected Universal Cytokine product
UCART-19 :	CAR-T cells allogéniques anti-CD19
UMAP :	Uniform Manifold Approximation and Projection

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

PREMIÈRE PARTIE : Les CAR-T cells dans les leucémies aiguës lymphoblastiques B de l'enfant et de l'adulte jeune : une thérapie innovante et prometteuse

Figures

Figure 1.	Activation lymphocytaire T : formation de la synapse immunologique	9
Figure 2.	Représentation schématique d'un CAR.....	10
Figure 3.	Les différentes générations de CAR.....	11
Figure 4.	Processus de fabrication des CAR-T cells autologues	13
Figure 5.	Méthodes de transduction virale et non virale du CAR dans les lymphocytes T	14
Figure 6.	Expression du marqueur CD19 dans la lignée B	19
Figure 7.	Classification EGIL des LAL de type B.....	21
Figure 8.	Classification OMS 2016 des LAL-B.....	22
Figure 9.	Principaux mécanismes expliquant les rechutes CD19-négatives	36
Figure 10.	Structure de la protéine CD19 "sauvage" et des protéines CD19 mutées prédites chez les patients en rechute CD19-négative.....	39
Figure 11.	Modèle du masquage de l'épitope CD19	42

Tableau

Tableau 1.	Principaux résultats d'études prospectives publiées.....	30
-------------------	---	-----------

DEUXIÈME PARTIE : Mise en place de l'approche CITE-seq

Figures

Figure 12.	Protocole de couplage des anticorps (AC) avec leur code-barre oligonucléotide (BC) et validation fonctionnelle par FACS.....	46
Figure 13.	Préparation des bibliothèques 10X pour une expérience CITE-Seq.....	49

TROISIÈME PARTIE : Article en révision dans Nature Communications

Figures

Fig. 1	CD19neg B-ALL relapse following CAR-T therapy	56
Fig. 2	Detection of CD19neg B-ALL clones before CAR-T treatment.....	57

Supplementary Table

Table S 1.	Oligonucleotide sequences.....	62
-------------------	---------------------------------------	-----------

Supplementary Figures

Figure S 1.	Flow cytometry immunophenotyping of leukemic blasts.	63
Figure S 2.	KLF6 expression in tumoral clusters.....	63
Figure S 3.	Analysis of CD19 transcriptional expression.	64
Figure S 4.	Non-functional CD19 mRNA isoform is expressed in leukemic cells.	64
Figure S 5.	FACS analysis of CD19neg cells before CAR-T treatment.	65

INTRODUCTION

Le traitement du cancer s'est récemment orienté vers une médecine de précision, permettant une meilleure individualisation des soins en proposant au patient un traitement adapté aux anomalies de sa tumeur. Cette médecine dite « personnalisée », repose principalement sur deux types d'approches : les thérapies ciblées et l'immunothérapie¹.

Tout d'abord, les thérapies ciblées ont pour objectif de bloquer la croissance ou la propagation de la tumeur, en interférant avec des anomalies moléculaires ou avec des mécanismes qui sont à l'origine du développement ou de la dissémination des cellules tumorales. Ces traitements ont ainsi pour but de ne détruire que les cellules cancéreuses, en épargnant au maximum les cellules saines. D'autre part, l'immunothérapie anti-tumorale a connu un boom en cancérologie au cours de ces dernières années, en raison de l'explosion des connaissances fondamentales sur l'immunologie du cancer. En effet, cette maladie n'est plus considérée du seul point de vue de la tumeur, mais également comme une maladie de l'environnement tumoral et du système immunitaire. Les traitements d'immunothérapie spécifique vont ainsi restaurer l'efficacité du système immunitaire et lui permettre de détruire les cellules cancéreuses, en agissant sur des cibles particulières de la tumeur ou sur son micro-environnement. Cette stratégie thérapeutique a donc une action indirecte sur la tumeur, et repose sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux, notamment les inhibiteurs de points de contrôle immunitaire² (anti-PD1 (Nivolumab, Pembrolizumab), anti-PDL1 (Atezolizumab, Avelumab), anti-CTLA4 (Ipilimumab)...), les anticorps bispécifiques (Blinatumomab³), et dernièrement, sur des thérapies cellulaires adoptives dont le but est de sélectionner et/ou créer des cellules immunitaires plus puissantes. Dans ce contexte, l'équipe de Steven Rosenberg a été la première capable d'utiliser des lymphocytes T activés ex-vivo et spécifiques d'antigènes associés aux tumeurs (TAA : tumor-associated antigen). Ces « lymphocytes T infiltrant la tumeur », les TILs, ont conduit à de très bonnes réponses cliniques chez l'homme, dans le cadre de mélanomes avancés⁴. Ces résultats encourageants ont amené au développement de structures moléculaires présentant de meilleures fonctionnalités, soit en améliorant la qualité du TCR utilisé, soit en permettant au lymphocyte T de lier sa cible en utilisant des constructions améliorant l'affinité du TCR pour son ligand. Ainsi, les avancées de la biologie moléculaire et le développement d'outils variés de manipulation génétique ont permis de « reprogrammer » les lymphocytes T afin d'améliorer ex vivo la qualité des lymphocytes qui seront transférés au patient.

Une première stratégie consiste à transférer, dans les lymphocytes cytotoxiques, un TCR modifié afin qu'il présente une très forte affinité pour l'antigène tumoral : ce sont les haTCR T cells (high affinity TCR-engineered T cell)⁵⁻⁷. Cependant, une des limitations de ces haTCR T cells est leur restriction à un phénotype HLA dans lequel le peptide est présenté. Un autre paramètre limitant le développement de ces TCR transgéniques est leur faible affinité qui découle du processus de sélection thymique⁸. Ainsi, une seconde méthode d'immunothérapie adoptive consiste à faire exprimer aux lymphocytes T 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. Ces lymphocytes T génétiquement modifiés sont appelés « CAR (*Chimeric Antigen Receptor*)-T cells ». Les CAR-T cells appartiennent à la catégorie des médicaments de thérapie innovante (MTI), qui sont des médicaments à usage humain comprenant la thérapie génique, la thérapie cellulaire somatique, l'ingénierie tissulaire et les médicaments combinés de thérapie innovante et sont régis par le règlement n°2007/1394 du Parlement Européen. Ces cellules CAR-T ont permis d'obtenir des résultats cliniques impressionnants dans le traitement des hémopathies lymphoïdes B, et plus particulièrement dans les leucémies aiguës lymphoblastiques B (LAL-B), en rechute ou réfractaires aux traitements conventionnels⁹. Bien que cette thérapie ait révolutionné le traitement de la leucémie aiguë lymphoblastique B chez les enfants et les jeunes adultes, 30 à 40 % des patients rechutent après une réponse complète, et environ la moitié de ces rechutes sont CD19-négatives¹⁰⁻¹².

Dans une première partie sera abordée la présentation des cellules CAR-T : du concept immunologique initial au processus de développement, leur indication dans les LAL-B de l'enfant et du jeune adulte ainsi que leurs limites. La deuxième partie concerne la mise en place de l'approche single-cell et du protocole CITE-seq. Enfin, la troisième partie sera présentée sous forme d'article dont l'objectif a été d'évaluer, par single-cell RNA sequencing (scRNA seq), la présence possible de sous-clones leucémiques CD19-négatifs avant traitement par CAR-T cells, pouvant être à l'origine de l'échec de cette thérapie.

PREMIÈRE PARTIE :

Les CAR-T cells dans les leucémies aiguës lymphoblastiques B de l'enfant et de l'adulte jeune : une thérapie innovante et prometteuse

I. Les CAR-T cells : biologie, concepts et principes

I.1. Généralités : activation lymphocytaire T

L'activation des lymphocytes T (LT) est un processus finement régulé qui nécessite plusieurs signaux, permettant la mise en place d'une réponse immunitaire anti-infectieuse ou anti-tumorale efficace (Figure 1). Le signal 1 est médié par la reconnaissance du lymphocyte T naïf, via son TCR (chaîne α et β), d'un fragment antigénique présenté par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) exprimées à la surface des cellules présentatrices d'antigène (CPA). L'interaction entre le CMH et le TCR constitue donc le premier signal d'activation. Cependant, en l'absence de signal supplémentaire, le lymphocyte T deviendra anergique. Le signal 2, appelé « signal de costimulation », est médié par l'interaction entre des molécules de co-stimulation (CD28, CD40, OX40L, CD137 (4-1BB), CD27...) présentes à la surface des lymphocytes T activés et leurs ligands respectifs exprimés sur la CPA (CD80 (B7-1), CD86 (B7-2)...). Cette interaction aboutit à la formation de la synapse immunologique au centre de laquelle se trouve le TCR lié au CMH et, en périphérie, les molécules de costimulation et d'adhésion (Intercellular Adhesion Molecule 1/Lymphocyte Function-Associated Antigen-1 (ICAM-1/LFA-1) et LFA-3/CD2). La formation de cette synapse immunologique induit l'activation optimale des lymphocytes T, aboutissant au signal 3, dit signal cytokinique. Ce dernier conduit à la sécrétion de cytokines telles que l'interleukine-2 (IL-2), à l'expansion clonale et à la différenciation des lymphocytes T en cellules effectrices¹³.

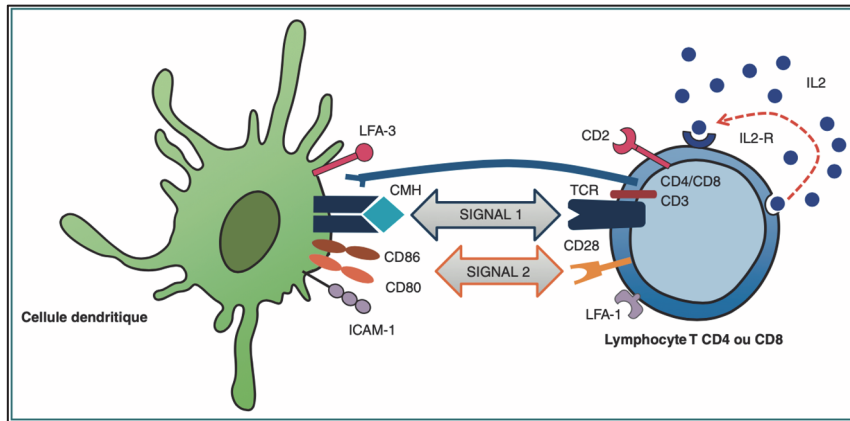


Figure 1. Activation lymphocytaire T : formation de la synapse immunologique¹³

Le signal 1 d'activation, correspond à l'interaction du récepteur des LT (TCR) avec les molécules du CMH exprimée à la surface des cellules présentatrices d'antigène (ici, cellule dendritique). Le signal 2 dit de co-stimulation désigne l'interaction du récepteur CD28 présent sur les LT avec ses ligands CD80 et CD86 exprimés par les CPA. Le signal 3, dit signal cytokinique conduit à la sécrétion de cytokines telles que l'interleukine-2 (IL-2), à l'expansion clonale et la différenciation des lymphocytes T en cellules effectrices.

I.2. Structure des CAR-T cells

Les CAR-T cells sont des lymphocytes T prélevés chez un patient, modifiés génétiquement ex-vivo de manière à exprimer à leur surface un récepteur antigénique chimérique (CAR) reconnaissant des antigènes spécifiques de cellules tumorales. 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 de l'immunoglobuline synthétique (Figure 2). Ainsi, la reconnaissance de l'antigène cible par le CAR est indépendante du CMH¹⁴. Il a fallu ensuite reproduire les signaux d'activation lymphocytaire sans utiliser le recours initial « classique » du TCR, l'objectif étant la reconnaissance spécifique puis l'élimination des cellules cancéreuses porteuses de l'antigène cible.

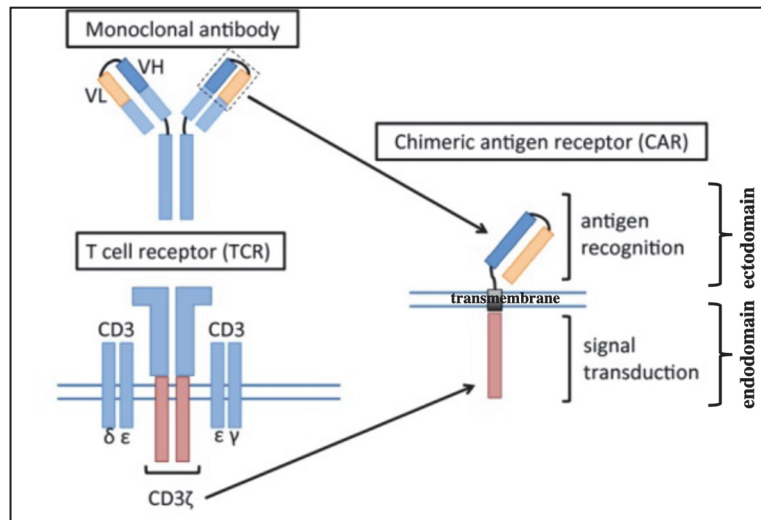


Figure 2. Représentation schématique d'un CAR¹⁵

Le récepteur antigénique chimérique (CAR) consiste à combiner un domaine variable à chaîne unique dérivé d'un anticorps monoclonal spécifique de l'antigène cible, à un domaine transmembranaire et un domaine de transduction du signal du récepteur des cellules T (TCR).

Ainsi, un CAR est constitué de 3 domaines distincts : un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire (Figure 2)^{9,16-18}.

- Le domaine extracellulaire constitue le domaine de reconnaissance de l'antigène cible. Il s'agit de la combinaison de chaînes protéiques issues de la région variable d'une chaîne lourde (VH) et d'une chaîne légère (VL) d'une immunoglobuline, reliées entre elles par un « linker » de petite taille (10 à 25 AA). Cet ensemble forme alors une protéine de fusion appelée Single-Chain Variable Fragment ou scFv.
- Le domaine transmembranaire est responsable de l'ancrage et de la stabilité du CAR.
- Le domaine intracellulaire est impliqué dans la signalisation lymphocytaire T. Il transmet l'activation et les signaux de co-stimulation par l'intermédiaire de la chaîne zeta du CD3 (CD3ζ) et des domaines de co-stimulation (CD28 ou 4-1BB), nécessaires aux fonctions effectrices et à l'expansion du lymphocyte T¹⁹.

I.3. Évolution des cellules CAR-T

Le développement initial des CAR-T cells a débuté en 1989, avec l'équipe du Pr. Gross, qui est la première à rapporter l'utilisation d'un récepteur antigénique chimérique dans un lymphocyte T^{20,21}. Les cellules CAR-T ont ensuite évolué en plusieurs générations successives, en fonction des caractéristiques de leur domaine intracellulaire²² (Figure 3).

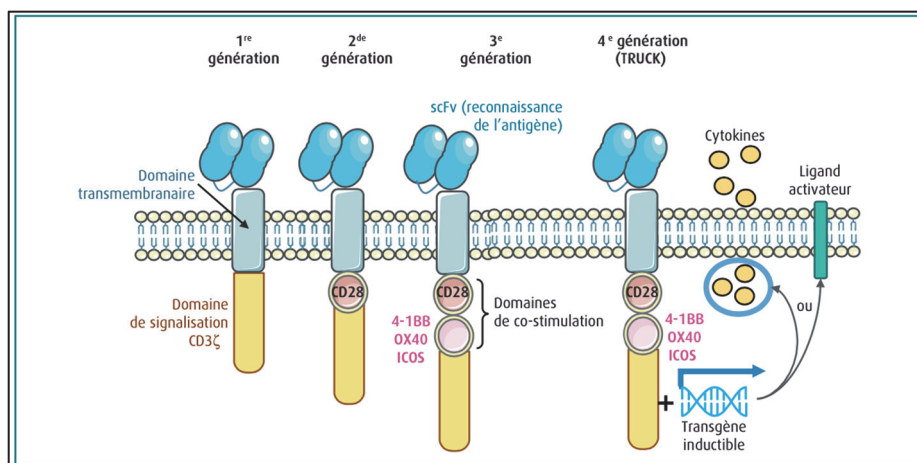


Figure 3. Les différentes générations de CAR²³

Les CAR-T cells de 1^{ère} génération comprennent une partie du fragment variable d'immunoglobuline (scFv) fusionné à un domaine d'activation CD3 ζ . Les CAR-T cells de 2^{ème} génération ont un domaine de co-stimulation intracellulaire supplémentaire, habituellement CD28 ou 4-1BB (CD137). Ceux de 3^{ème} génération combinent plusieurs domaines de co-stimulation. Enfin, Les CAR-T de 4^{ème} génération sont construits avec un élément inducible par activation permettant la sécrétion d'un produit transgénique tel que des cytokines ou bien un ligand activateur.

I.3.1. CAR-T cells de 1^{ère} génération

Les CAR de 1^{ère} génération étaient composés uniquement de la région variable (scFv) d'immunoglobuline d'origine murine reconnaissant l'antigène cible, du domaine transmembranaire et du domaine intracellulaire de signalisation de la molécule CD3 ζ . Les expérimentations in vivo de ces CAR-T cells de 1^{ère} génération dans les modèles animaux ont montré que le niveau d'activation et d'expansion était insuffisant pour produire une réponse anti-tumorale durable et efficace²⁴. En effet, ces cellules CAR-T ne pouvaient pas produire suffisamment d'interleukine-2 (IL-2), de sorte que pour éliminer les cellules tumorales, il était nécessaire d'administrer de l'IL-2 exogène²⁵.

I.3.2. CAR-T cells de 2^{ème} génération

Une 2^{ème} génération de CAR a ainsi été développée afin d'augmenter l'activation, la survie et la fonctionnalité in vivo des CAR-T cells²⁶. Cette seconde génération contient, en plus de la sous-unité CD3 ζ , un domaine de co-stimulation, habituellement CD28²⁷ ou 4-1BB²⁸. Les profils cytotoxiques et métaboliques de ces CAR-T cells diffèrent selon le domaine de co-stimulation choisi. Les CAR-T cells avec CD28 semblent avoir une meilleure activité cytotoxique avec un effet anti-tumoral plus précoce, dû en partie à une expansion plus rapide des lymphocytes T, et seraient associés à un phénotype « effecteur mémoire ». Le domaine 4-

1BB s'accompagnerait quant à lui, d'une réponse plus progressive, d'une meilleure longévité des cellules CAR-T et d'une différenciation de type « centrale mémoire »^{29,30}.

A ce jour, deux CAR-T cells de seconde génération possèdent une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) en France : Tisagenlecleucel (Kymriah[®]) et Axicabtagene ciloleucel (Yescarta[®]) respectivement pourvus des domaines de co-stimulation 4-1BB et CD28. Le Tisagenlecleucel (Kymriah[®]) est indiqué dans le traitement de la LAL-B de l'enfant et du jeune adulte réfractaire ou en rechute et dans le traitement de lymphomes B diffus à grandes cellules chez les patients adultes réfractaires ou en rechute³¹. L'Axicabtagene ciloleucel (Yescarta[®]) est indiqué chez les patients adultes atteints de lymphomes B diffus à grandes cellules réfractaires ou en rechute³².

I.3.3. CAR-T cells de 3^{ème} génération

La 3^{ème} génération de CAR a été réalisée en combinant plusieurs domaines de co-stimulation tels que CD28, 4-1BB, OX40, ICOS, CD27, NKG2D, afin d'augmenter l'activité anti-tumorale avec une production de cytokines plus forte, une activité cytotoxique plus importante et plus spécifique et une capacité d'expansion augmentée après une exposition répétée à l'antigène³⁰. Cependant à ce jour, il n'a pas été montré que ces CAR de troisième génération permettent d'obtenir de meilleurs résultats que les CAR de deuxième génération. Par conséquent, des études supplémentaires seraient nécessaires pour étudier davantage la sécurité et l'efficacité de ces traitements¹⁶.

I.3.4. CAR-T cells de 4^{ème} génération

Les CAR de 4^{ème} génération sont des cellules dites TRUCKs (T cells Redirected Universal Cytokine product), qui contiennent en plus un transgène inductible par la reconnaissance de l'antigène cible par le CAR, permettant l'expression de co-récepteurs, la sécrétion de cytokines ou d'autres ligands activateurs³³.

L'exemple le plus prometteur à ce jour est la sécrétion d'IL-12 par les TRUCKs. Cette cytokine favorise l'activation et la différenciation des lymphocytes Th1 anti-tumoraux, module le micro-environnement tumoral et recrute des cellules immunitaires potentialisant ainsi l'activité anti-tumorale des CAR-T cells (réduction des T régulateurs, activation de cellules NK

et macrophages). L'avantage de ces TRUCKs est que l'IL-12 est produite aussi longtemps que les CAR-T cells reconnaissent leur cible. De plus, cette nouvelle technologie, en recrutant et en activant des cellules immunitaires innées via la sécrétion d'IL-12, entraîne une réponse inflammatoire permettant également d'éviter le phénomène d'échappement et de rechute dû à des cellules tumorales non reconnues par les CAR. Cette nouvelle génération n'est pas encore entrée en phase d'essai clinique³⁴.

I.4. Modes de production des CAR-T cells et sources cellulaires

I.4.1. CAR-T cells autologues

La production de CAR-T cells destinés à cibler un antigène tumoral spécifique repose sur le respect de règles de bonnes pratiques de fabrication permettant d'assurer la sécurité, l'efficacité et la reproductibilité de la production. Il s'agit donc d'un processus nécessitant plusieurs étapes bien codifiées (Figure 4).

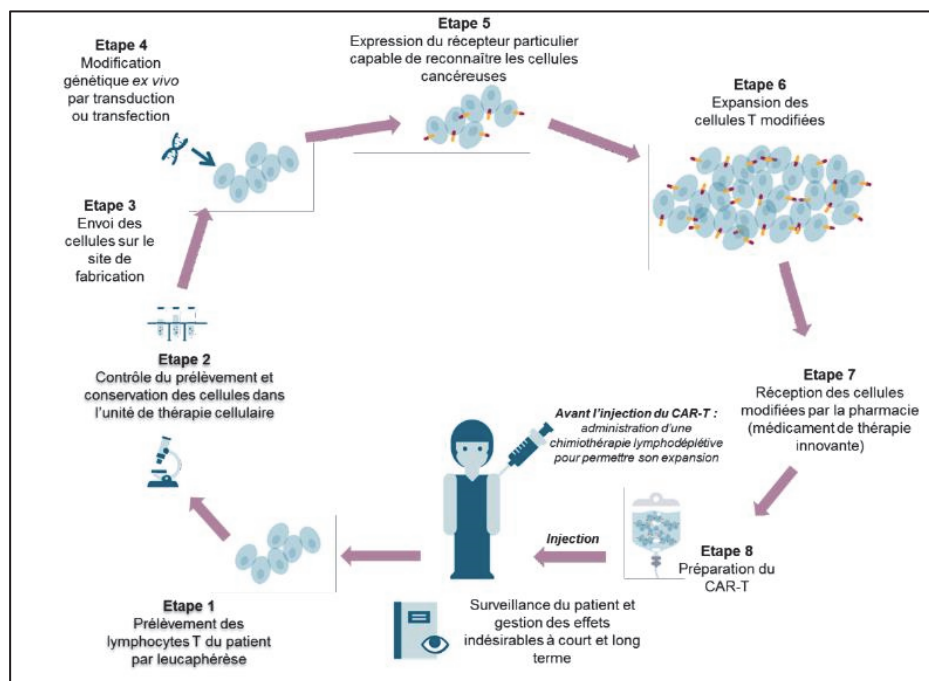


Figure 4. Processus de fabrication des CAR-T cells autologues³⁵

I.4.1.1. Leucaphérèse

Tout d'abord, les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) du patient sont prélevées par leucaphérèse dans une unité de thérapie cellulaire. Le produit collecté est ensuite transféré dans un lieu de production agréé aux bonnes pratiques de fabrication (BPF). Les lymphocytes T y sont isolés, enrichis et lavés afin de les séparer des autres leucocytes. Une fois isolés, les lymphocytes T sont ensuite activés et stimulés grâce à des billes magnétiques recouvertes d'anticorps monoclonaux anti-CD3 et anti-CD28³⁶ et de cytokines.

Certaines données précliniques suggèrent que le ratio CD4/CD8 et le phénotype (naïf (Tn), central mémoire (Tcm), effecteur mémoire (Tem), effecteur terminal (Tet)) des CAR-T cells auraient un impact sur leur efficacité, leur capacité de prolifération et leur toxicité. Les lymphocytes Tn et Tcm auraient une meilleure capacité proliférative et une longévité plus longue que les Tem et les Tet. Ces derniers auraient une durée de vie limitée bien que leur fonction cytotoxique soit augmentée. Ainsi, les CAR-T cells issues de lymphocytes Tcm permettraient une efficacité plus importante des protocoles de transfert cellulaire adoptif, même si ceci reste à démontrer en clinique. Enfin, il s'avère possible de sélectionner des sous populations lymphocytaires T avant transduction, de favoriser la génération de lymphocytes T moins différenciés (Tcm) en culture grâce au cocktail de cytokines utilisé et d'ajuster le rapport CD4/CD8 dans le produit final^{23,37,38}.

I.4.1.2. Méthodes de transduction du CAR dans les lymphocytes

L'introduction du matériel génétique codant pour le CAR dans le lymphocyte T est réalisée grâce à des techniques utilisant ou non des systèmes viraux (Figure 5).

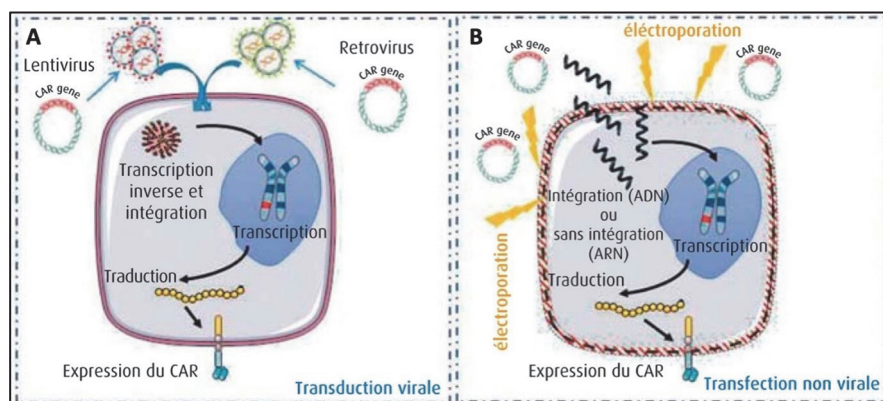


Figure 5. Méthodes de transduction virale et non virale du CAR dans les lymphocytes T²³

A) Stratégies de transduction virales avec des gamma-rétrovirus ou lentivirus.

B) Stratégie de transduction non virale par électroporation.

I.4.1.2.1. Stratégies virales

Actuellement, la transduction virale avec des vecteurs gamma-rétroviraux ou lentiviraux essentiellement, est la méthode de transfert de gènes la plus fréquemment utilisée pour la thérapie génique³⁹ (Figure 5A).

Ces vecteurs viraux possèdent un génome à base d'ARN converti en ADN dans les cellules transduites par une rétrotranscriptase d'origine virale, permettant ainsi l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte et une expression génétique stable et permanente du transgène : ces virus sont qualifiés de virus intégratifs. L'état d'activation des cellules lors de la transduction constitue la différence majeure entre les deux sous-types : les gamma-rétrovirus ne peuvent infecter que les cellules en cours de division cellulaire, ce qui n'est pas le cas pour les lentivirus. En effet, le site d'intégration des rétrovirus semble être non aléatoire et certaines données suggèrent une préférence pour l'insertion dans les promoteurs des gènes et dans les unités transcriptionnelles de la cellule hôte. Cette insertion peut entraîner une expression génique aberrante et un risque de mutation d'oncogènes par mutagenèse insertionnelle. Ce phénomène n'a cependant pas été observé à ce jour avec les CAR-T cells contrairement aux approches de thérapies géniques dans les cellules souches hématopoïétiques. Cependant, une surveillance à plus long terme permettra d'évaluer ce risque éventuel dans le cas de transduction de cellules matures^{36,40}. Les lentivirus nécessitent la présence de plusieurs gènes régulateurs pour infecter la cellule hôte et présenteraient théoriquement un risque de mutagenèse insertionnelle plus faible, car leur intégration se fait généralement loin des régions promotrices de la cellule hôte. Des vecteurs viraux non-intégratifs (non-integrating lentiviral vector (NILV) et adénovirus) sont en cours d'étude afin de limiter davantage ce risque⁴¹.

Ainsi, le Tisagenlecleucel (Kymriah[®], Novartis) est généré à partir d'un rétrovirus et l'Axicabtagene ciloleucel (Yescarta[®], Gilead/Kite) à partir d'un lentivirus.

I.4.1.2.2. Stratégies non virales

Des méthodes alternatives de transfert génique non virales ont également été testées. Ces différents systèmes incluent des systèmes physiques (comme l'électroporation) ou chimiques (comme les nanoparticules) (Figure 5B).

L'électroporation est actuellement la technique non virale la plus utilisée. Elle consiste à appliquer un courant électrique sur les cellules dans le but d'augmenter la perméabilité cellulaire et permettre l'introduction de vecteurs non-viraux, des plasmides (ADN à double brin doué de réplication autonome), puis l'intégration de l'ADN du gène codant pour le CAR dans le génome des lymphocytes T. Des systèmes de type transposon/transposase (Sleeping Beauty ou piggyBac)^{42,43} et de transfection d'ARN messager (expression transitoire du gène) sont en cours d'étude. Cette technique de transgénèse est plus rapide, théoriquement plus sûre et plus économique que les stratégies virales mais la viabilité cellulaire paraît toutefois altérée³⁶.

Les nanoparticules combinent, quant à elles, une enveloppe recouverte de fragments Fab d'anticorps reconnaissant le co-récepteur CD3e des lymphocytes T permettant de les cibler et de les transfecter par endocytose ; un système d'importation nucléaire efficace du transgène et une intégration chromosomique de la séquence CAR stable grâce à un système de type transposon/transposase piggyBac. Ces nanoparticules peuvent reprogrammer les lymphocytes T *in vivo* pour leur faire exprimer un CAR⁴⁴. La sécurité de ces systèmes doit encore être évaluée chez l'homme mais le recours aux nanotechnologies s'avère prometteur par son efficacité et sa réduction des coûts de production.

I.4.1.3. Culture ex-vivo et expansion des lymphocytes

Différents systèmes de culture cellulaire peuvent être utilisés pour le processus d'activation et d'expansion des CAR-T cells.

L'expansion des cellules T *ex-vivo* est réalisée dans un bioréacteur et nécessite des signaux d'activation, des milieux de culture appropriés et une vaste expertise⁴⁵. Elle se fait notamment en présence de cytokines telles que IL-2, IL-7, IL-12, IL-15 ou IL-21. Des cellules artificielles présentatrices d'antigènes peuvent être également utilisées (cellules tumorales K562 irradiées ou cellules transformées par EBV). Cette fabrication de CAR-T cells autologues s'accompagne d'un délai de production parfois long (2 à 4 semaines environ), d'une lourdeur logistique et de coûts importants. Cependant, la durée optimale de l'expansion *ex-vivo* reste inconnue. La génération de cellules T capables de proliférer après un transfert *in vivo* est obligatoire et les données actuelles préconisent l'utilisation de cellules T avec un phénotype moins différencié³⁷. Des périodes de culture plus longues seraient donc plus coûteuses et moins pratiques.

Après expansion ex-vivo, les billes magnétiques ayant permis l'isolement et l'activation des lymphocytes T sont retirées, les cellules sont récoltées, lavées et cryopréservées, afin d'assurer la viabilité cellulaire durant le transport et le stockage au centre de traitement avant administration au patient. Des contrôles qualité sont nécessaires tout au long du processus pour garantir la sécurité et l'efficacité du produit.

Les cellules CAR-T cryopréservées sont alors renvoyées au centre de traitement où elles sont décongelées et perfusées au patient, qui aura au préalable, reçu une chimiothérapie lymphodéplétive (sauf si son taux de globules blancs au cours de la semaine précédant la perfusion est $\leq 1\ 000$ cellules/ μL^{36}). En effet, les études précliniques et cliniques ont montré que la prolifération et la persistance des CAR-T cells sont augmentées par une lymphodéplétion pré-perfusion, se faisant principalement par l'administration de Cyclophosphamide et Fludarabine⁴⁶.

I.4.2. CAR-T cells allogéniques

La difficulté de récolter un nombre suffisant de lymphocytes T autologues intacts, à partir de patients très souvent lymphopéniques, constitue un des obstacles majeurs au développement clinique de la thérapie génique et cellulaire en condition autologue⁴⁷. La production des CAR-T cells allogéniques suit un processus similaire à celui précédemment décrit pour les CAR-T cells autologues, mais les lymphocytes génétiquement modifiés proviennent d'un donneur sain et non du patient qui sera traité. Ces CAR-T cells allogéniques exposent le patient à un risque de maladie du greffon contre l'hôte (GVH). Ce risque peut être prévenu par une étape supplémentaire d'édition génétique permettant l'invalidation de l'expression du TCR endogène des cellules du donneur et plus ou moins du CMH.

Il existe plusieurs stratégies capables d'invalider l'expression du TCR et/ou du CMH. Les plus étudiées sont le système TALEN (Transcription Activator like effector nucleases), qui permet de couper précisément certaines régions de l'ADN ; et le CRISPR/Cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeat), qui est un ciseau moléculaire comprenant un ARN guide (gRNA), capable de reconnaître une séquence d'ADN cible, et une nucléase Cas9, clivant spécifiquement cette séquence reconnue.

Le premier CAR-T allogénique, UCART-19 (anti-CD19), a été développé par la société française Cellectis et utilise le système TALEN pour invalider le TCR et le CD52 à la surface des CAR-T cells, les rendant ainsi insensibles à l'Alemtuzumab utilisé dans le régime lymphodéplétant avant administration des CAR-T cells. Les résultats de la première étude de phase I dans la LAL-B réfractaire de l'enfant sont encourageants (5 réponses moléculaires à J28 sur 7 patients traités, 1 GVH de grade I). Ce produit est en cours d'étude avec le laboratoire SERVIER dans les LAL-B en rechute ou réfractaires en Europe et aux États-Unis⁴⁸.

Cette approche permettrait ainsi de produire des cellules CAR-T en grande quantité à partir des lymphocytes T d'un seul donneur sain, et de diminuer ainsi les coûts et les délais de production.

I.5. Sélection de la cible du CAR dans les LAL-B

Le choix de la cible est primordial pour garantir une efficacité optimale et une toxicité acceptable. Idéalement, les antigènes ciblés par les CAR-T cells devraient être exprimés de façon uniforme, importante et spécifique sur les cellules tumorales, et par conséquent, non exprimés sur les cellules saines. Cependant, ce critère ne permet pas à lui seul de déterminer l'efficacité des CAR-T cells. En effet, l'hétérogénéité d'expression antigénique sur les différents clones tumoraux et la sélection clonale peuvent conduire à l'échec du traitement par CAR-T cells. De plus, le choix de l'antigène cible va être en partie responsable de la toxicité des CAR-T cells par l'induction d'un effet « on-target/off-tumor » lié à la destruction des cellules saines par les CAR-T cells, en cas d'expression partagée de la cible antigénique en dehors des cellules tumorales. Ce type d'antigène unique, exclusivement exprimé à la surface des cellules tumorales étant difficile à trouver, la meilleure alternative reste soit un antigène exprimé par une seule lignée cellulaire et dont la fonction n'est pas indispensable ou remplaçable, soit un antigène dont l'expression est différente entre les cellules saines et les cellules tumorales.

En onco-hématologie, les CAR-T cells dirigées contre le CD19 (CART-19) ont révolutionné le traitement des hémopathies lymphoïdes B réfractaires ou en rechute. Cette réussite est liée à l'expression habituelle du CD19 à la surface des clones tumoraux B alors que cette cible antigénique n'est pas exprimée à la surface des cellules souches hématopoïétiques ni dans d'autres tissus normaux. Le CD19 est cependant exprimé à la surface

des lymphocytes B non tumoraux et de leurs précurseurs (Figure 6). La persistance des CAR-T cells est ainsi associée à une aplasie B et à une hypogammaglobulinémie profonde, pouvant être compensée par des injections substitutives d'immunoglobulines polyvalentes⁴⁹. D'autres molécules spécifiques de la lignée B, comme le CD22, présentent le même intérêt et sont en cours d'étude et de développement⁵⁰.

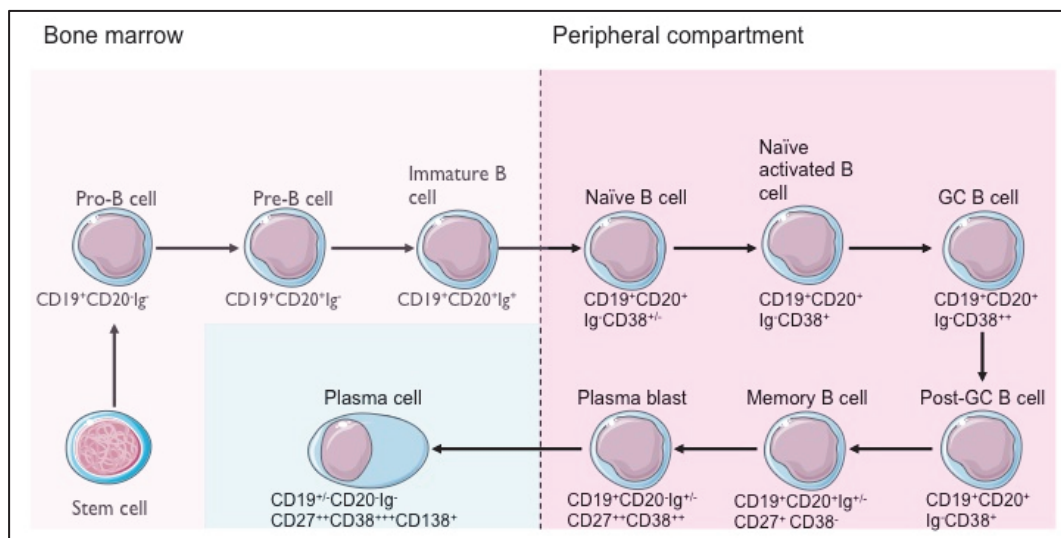


Figure 6. Expression du marqueur CD19 dans la lignée B⁵¹

Les stades de maturation des cellules B sont indiqués en fonction de leur site anatomique et de l'expression des marqueurs à leur surface. Le CD19 est absent à la surface des cellules souches hématopoïétiques, puis exprimé du stade Pro-B au stade de plasmocyte, où son expression est diminuée.

II. Les CAR-T cells dans les leucémies aiguës lymphoblastiques B (LAL-B)

II.1. Généralités sur la pathologie

II.1.1. Définition

Les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) sont des proliférations malignes aboutissant à l'accumulation clonale dans la moelle osseuse, le sang et éventuellement d'autres organes hématopoïétiques, de cellules immatures de la lignée lymphoïde : les lymphoblastes, arrêtées à un stade précoce de leur différenciation. Elles se définissent par un envahissement médullaire $\geq 20\%$ de blastes (OMS 2008)⁵². Il en résulte une répression de l'hématopoïèse normale qui conduit à une insuffisance médullaire et à des symptômes résultant de l'anémie (pâleur, fatigue), la neutropénie (infections) et la thrombopénie (ecchymoses, saignements)⁵³.

II.1.2. Incidence

Les LAL représentent 80% des leucémies aiguës de l'enfant, et 20% des leucémies aiguës de l'adulte, avec 2 pics de fréquence : chez l'enfant de 2 à 10 ans (75% des cas sont diagnostiqués avant 6 ans) et chez l'adulte à partir de 50 ans⁵⁴. Leur incidence est de 1,5 nouveau cas pour 100 000 habitants/an, soit environ 1000 nouveaux cas de LAL par an en France⁵⁵. Bien qu'il s'agisse d'une hémopathie rare, les LAL représentent néanmoins le cancer le plus fréquent de l'enfant, l'adolescent et l'adulte jeune. Leur pronostic est hétérogène et tient compte de plusieurs facteurs liés aux caractéristiques de la leucémie (leucocytose, atteinte neuro-méningée, facteurs cytogénétiques), à l'âge et à la sensibilité aux traitements appréciée par la maladie résiduelle après obtention d'une rémission complète⁵⁶.

Les LAL peuvent être classées en deux types selon la lignée d'appartenance des blastes :

- Les LAL-B, les plus fréquentes, représentent environ 85% des cas chez l'enfant,
- Les LAL-T, environ 15% des cas.

Comme évoqué précédemment, ce sont les cellules de la lignée B qui pourront être ciblées par les CAR-T cells via le marqueur CD19. La suite du travail concernera donc exclusivement les LAL-B.

II.1.3. Classification des LAL-B

II.1.3.1. Classification EGIL

L'immunophénotypage médullaire est indispensable pour confirmer le diagnostic de LAL-B. Il est défini en reprenant les stades normaux de maturation des cellules lymphoïdes dans la moelle osseuse (classification de l'EGIL⁵⁷) (Figure 7).

	cCD79a, CD22, CD19	CD10	μ	Ig de surface
B-I (Pro-B)	+	-	-	-
B-II (B commune)	+	+	-	-
B-III (Pré-B)	+	+	+	-
B-IV (B mature)	+	+/-	+/-	+

Figure 7. Classification EGIL des LAL de type B

II.1.3.2. Classification OMS 2016

L'Organisation mondiale de la Santé (OMS) décrit un certain nombre d'anomalies cytogénétiques récurrentes dans les LAL-B. Leur recherche est indispensable car les anomalies retrouvées influent sur la nature du traitement et conditionnent le pronostic. On identifie parmi celles-ci, des anomalies de nombres (gains ou pertes de chromosomes) et des anomalies de structure (translocation, délétion, inversion, amplification...), dont les plus significatives dans les LAL sont les translocations réciproques. La classification OMS sépare les LAL avec anomalies génétiques récurrentes, des autres dites «not otherwise specified» (B other). La classification de 2008 retient sept anomalies récurrentes. Elle a été mise à jour en 2016⁵⁸, avec l'intégration de deux nouvelles entités provisoires : LAL-B BCR-ABL1-like et LAL-B avec iAMP21 (Figure 8). Chez l'enfant, l'hyperdiploïdie (> 50 chromosomes) et la translocation t(12;21), correspondant au transcrite de fusion ETV6-RUNX1 ou TEL-AML1, représentent à elles seules environ 50% des LAL pédiatriques et sont associées à des pronostics favorables⁵⁹.

<p>Leucémie/lymphome B, NOS</p> <p>Leucémie/lymphome B avec anomalies cytogénétiques récurrentes</p> <p>Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec t(9;22)(q34;q11.2) ; BCR-ABL1</p> <p>Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec t(v;11q23) ; MLL (maintenant KMT2A) réarrangé</p> <p>Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec t(12;21)(p13;q22) ; TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)</p> <p>Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec hyperdiploïdie</p> <p>Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec hypodiploïdie</p> <p>Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec t(5;14)(q31;q32) ; IL3-IGH</p> <p>Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec t(1;19)(q23;p13.3) ; TCF3-PBX1</p> <p>Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B, BCR-ABL1 - like</p> <p>Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec iAMP21</p>
--

Figure 8. Classification OMS 2016 des LAL-B⁵⁸

II.1.4. Prise en charge thérapeutique des LAL-B

II.1.4.1. Première ligne de traitement

Le pronostic des LAL de l'enfant et de l'adolescent s'est considérablement amélioré au cours de ces vingt dernières années, avec une survie sans évènement de 85% environ à cinq ans et une survie globale de 90% à cinq ans⁵⁴. Les protocoles de chimiothérapie intensive sont donc de plus en plus efficaces, mais sont aussi toxiques. Le protocole classique de traitement (exemple ci-dessous du protocole CAALL), comprend plusieurs phases thérapeutiques : une pré-phase à base de corticoïdes, puis une phase d'induction, de consolidation et d'entretien, associées à une prophylaxie neuroméningée administrée à intervalles réguliers tout au long de la thérapie^{60,61}. Toutes ces phases thérapeutiques vont se succéder sans intervalle. La durée totale du traitement variera entre 24 et 30 mois selon les groupes pronostiques, et les traitements de chaque phase dépendront également de cette classification.

- **Pré-phase.** Elle consiste en l'administration d'une dose de 60mg/m²/jour de Prednisone, associée à une administration intrathécale de Méthotrexate. Cette pré-phase permet de juger la cortico-sensibilité de la maladie : les patients ayant un compte de blastes périphériques < 1000/μL après 8 jours de traitement sont considérés comme cortico-sensibles et ont un pronostic plus favorable. Cette phase permet également de prévenir le syndrome de lyse tumoral et d'attendre la caractérisation cytogénétique et/ou moléculaire de la pathologie.

- Traitement d'induction. Il dure entre 4 à 6 semaines et est composé classiquement de corticoïdes (Prednisone ou Dexaméthasone), Vincristine et L-asparaginase, associés à une chimiothérapie intrathécale. Pour les LAL-B de haut risque, des anthracyclines sont généralement associées aux médicaments précédemment cités. L'objectif de l'induction est d'obtenir une rémission complète (taux de blastes dans la moelle $\leq 5\%$) atteinte dans plus de 95% des cas, et si possible, une maladie résiduelle (MRD) $<10^{-3}$.
- Traitement de consolidation. Ce traitement, d'une durée de 6 à 9 mois, vise à consolider la rémission et éradiquer les cellules leucémiques résiduelles. Les protocoles thérapeutiques peuvent varier en fonction du groupe pronostique, et peuvent comprendre une phase de ré-induction de 3 à 4 semaines (avec plus ou moins des anthracyclines) puis une phase de reconsolidation comprenant des agents non utilisés dans l'induction, tels que la 6-thioguanine, le Cyclophosphamide, l'Étoposide et la Cytarabine. Une prophylaxie neuroméningée par Méthotrexate associé à la Mercaptopurine est maintenue.
- Traitement d'entretien. La thérapie d'entretien dure généralement 2 ans ou plus et comprend des protocoles de chimiothérapie moins intenses, administrés de préférence par voie orale, à base de Méthotrexate et Mercaptopurine. La chimiothérapie intrathécale est poursuivie pendant cette phase d'entretien.

Une greffe de cellules souches hématopoïétiques (GCSH) lors d'une première rémission complète est indiquée chez moins de 10% des patients. Dans le protocole CAALL, les indications pour une GCSH sont donc :

- Les patients sans réponse complète à la fin de l'induction,
- Les patients avec une MRD $> 10^{-3}$ à la fin de la phase de consolidation,
- Les patients avec des anomalies cytogénétiques de mauvais pronostic (hypodploïdie < 40 chromosomes, t(17 ;19)/TCF3-HLF, réarrangement MLL...)

II.1.4.2. Première rechute

Malgré ces progrès thérapeutiques, 15 à 20% des patients en pédiatrie vont présenter une rechute. Les traitements envisageables de la première rechute en pédiatrie ou chez les jeunes adultes peuvent inclure les thérapeutiques suivantes^{60,61}:

- Une polychimiothérapie de rattrapage intensive suivie d'une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, pour les patients éligibles, après obtention d'une deuxième rémission complète,
- Un traitement par inhibiteur de tyrosine kinase anti BCR-ABL chez les patients porteurs du chromosome Philadelphie,
- L'Inotuzumab ozogamicine (Besponsa[®]) en cas d'expression du CD22 chez les patients de plus de 18 ans,
- Le Blinatumomab (Blincyto[®]) si expression du CD19 et chromosome Philadelphie négatif, chez les enfants à partir de 1 an en rechute après une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques ou à partir de la 2^{ème} rechute.

La décision thérapeutique repose sur de nombreux paramètres tels que l'âge du patient, son état général, la survenue d'une infection, les sites de rechute éventuellement extra-médullaires, le pourcentage de blastes médullaires, l'obtention d'une rémission et de la présence d'un donneur de cellules souches hématopoïétiques.

II.1.4.3. Rechutes ultérieures et maladie réfractaire

Chez les patients en situation de deuxième rechute ou de maladie réfractaire, le pronostic est plus péjoratif et la guérison est rare (entre 0 et 15%)⁶². La médiane de survie est généralement de moins de 6 mois (avis d'expert)⁶³. A ce stade de la maladie, il n'y a pas non plus de traitements standardisés. L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques est recommandée si elle n'a pas été reçue après la 1^{ère} rechute et qu'une rémission complète peut être obtenue. Parfois, une seconde greffe peut être envisagée.

Par conséquent, pour les LAL-B de stades avancés, en rechute ou réfractaires, il persiste un besoin médical mal couvert par les thérapeutiques actuelles, justifiant l'utilisation de nouveaux traitements tels que les CAR-T cells.

II.2. Place actuelle des CAR-T cells dans l'arsenal thérapeutique des LAL-B

Le développement des CAR-T cells pourrait permettre de révolutionner la prise en charge de toutes les formes graves de LAL-B, et ainsi proposer une nouvelle option thérapeutique curative⁶⁴.

Ainsi, les CAR-T cells anti-CD19 constituent un traitement de 1^{ère} intention chez les enfants et les jeunes adultes jusqu'à 25 ans, atteints de LAL-B réfractaire, en rechute après allogreffe ou à partir de la 2^{ème} rechute⁶³. D'après les critères d'inclusion des essais cliniques, cette indication correspond aux patients :

- En 2^{ème} rechute médullaire ou plus,
- Ou en rechute médullaire après une greffe de cellules souches hématopoïétiques allogénique, réalisée au moins 6 mois avant l'injection de CAR-T cells,
- Ou ayant une maladie réfractaire primaire, définie par l'absence de rémission complète après deux cycles de chimiothérapie,
- Ou ayant une maladie chimio-réfractaire définie par l'absence d'une rémission complète après 1 cycle de chimiothérapie chez les patients en rechute,
- Ou intolérants ou en échec à 2 lignes d'un inhibiteur de tyrosine kinase en cas de LAL-B avec chromosome Philadelphie positif,
- Ou inéligibles à une GCSH allogénique en raison de comorbidités, de contre-indications aux traitements de conditionnement à la GCSH, d'absence de donneur compatible, d'antécédent de GSCH ou de refus de la GCSH par le patient.

II.3. Résultats d'essais cliniques et d'études pilotes des CAR-T cells dans les LAL-B

Les cellules CAR-T sont actuellement investiguées dans plus d'une centaine d'essais cliniques, dont plusieurs ont rapporté l'efficacité des CAR-T cells de 2^{ème} génération ciblant le CD19 dans les LAL-B en rechute ou réfractaires de l'enfant et/ou du jeune adulte (Tableau 1). Il est cependant difficile de les comparer du fait de multiples variations entre elles qui concernent : les patients inclus (âge, prétraitement ou non par d'autres anti-CD19 tel que le Blinatumomab (Blinicyto[®])), la lymphodéplétion, la structure du CAR (domaines extracellulaires, de co-stimulation ou molécules charnières)...

Je présenterai ci-dessous, différents essais cliniques publiés, dont les résultats principaux sont résumés dans le tableau 1.

II.3.1. NCI NCT01593696 : Étude de dose de phase I⁶⁵

A l'Institut National du Cancer aux États-Unis, un premier essai de phase I d'escalade de dose a inclus 21 patients présentant une LAL-B réfractaire ou en rechute. Dans cette étude, les patients ont été traités par CAR-T cells anti-CD19 portant la molécule de co-stimulation CD28⁶⁵. La dose maximale tolérée a été définie à $1 \times 10^6/\text{kg}$. 14 % des patients ont présenté un syndrome de relargage cytokinique mais tous les effets secondaires ont été réversibles. 67% des patients ont obtenu une réponse complète à J28 post-injection et environ 57% étaient en rémission moléculaire. Parmi les 12 patients en rémission moléculaire, 10 ont reçu une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques au décours de l'injection de CAR-T cells, et étaient toujours en rémission un an après. Les deux patients qui n'avaient pas bénéficié d'une allogreffe de moelle ont cependant rechuté sous la forme d'une LAL-B CD19-négative.

Cette étude a été complétée par une seconde étude comparant différents schémas de lymphodéplétion⁶⁶. Au total, 51 patients présentant une LAL-B réfractaire primaire ou en rechute ont été inclus. Le suivi médian était de 18,7 mois et le taux de réponse complète obtenu était de 60,8 %. Une lymphodéplétion par Fludarabine/Cyclophosphamide était associée à une amélioration de la survie sans maladie. La probabilité de survie sans maladie était également plus élevée dans le groupe ayant bénéficié d'une allogreffe.

II.3.2. ELIANA NCT02435849 : Étude pivot de phase II non comparative¹⁰

L'essai ELIANA est une étude de phase II, non comparative, à une seule cohorte, menée dans 25 centres internationaux, portant sur la faisabilité, l'efficacité et la toxicité du Tisagenlecleucel (Kymriah[®]) chez des patients en pédiatrie et de jeunes adultes atteints de LAL-B CD19-positif en première rechute post-greffe, en deuxième rechute ou plus, ou réfractaire. Le Tisagenlecleucel (Kymriah[®]) est un CAR-T cell de 2^{ème} génération, portant la chaîne ζ du CD3 combinée à la molécule de costimulation 4-1BB. Les résultats de cet essai ont été publiés par Maude et al.¹⁰ en 2018, puis mis à jour par Grupp et al⁶⁷. Le principal critère d'évaluation était le taux de rémission global (le taux de rémission complète (RC) ou de rémission complète avec récupération hématologique incomplète (RCi)) dans les 3 mois).

Dans cette étude, 79 patients ont reçu une injection de Tisagenlecleucel (Kymriah[®]) après une chimiothérapie lymphodéplétive par Fludarabine-Cyclophosphamide, entre Avril 2015 et Avril 2017. Le taux de rémission global à 3 mois était de 82,3%, et tous les patients répondeurs au traitement avaient une maladie résiduelle indétectable par cytométrie en flux. Les taux de survie sans événement (EFS) et de survie globale (OS) étaient respectivement de 73% et 90%, à 6 mois et 50% et 76% à 12 mois. De plus, ces CAR-T cells autologues ayant le domaine de co-stimulation 4-1BB, semblent avoir une capacité de persistance importante puisque la durée médiane de persistance du Tisagenlecleucel (Kymriah[®]) dans le sang est d'environ 5 à 6 mois et le transgène a pu être détecté jusqu'à 20 mois après l'administration. Des effets indésirables de grade 3 ou 4, sont survenus chez 73% des patients. Le syndrome de relargage cytokinique est apparu chez 77% des patients, dont 48% ont reçu du Tocilizumab. Des événements neurologiques sont survenus chez 40 % des patients et ont été pris en charge avec des soins de soutien, et aucun œdème cérébral n'a été signalé.

Dans cette étude mondiale sur les CAR-T cells, une seule perfusion de Tisagenlecleucel (Kymriah[®]) a permis d'obtenir une rémission durable à long terme chez les enfants et les jeunes adultes atteints de LAL-B en rechute ou réfractaires, avec des effets toxiques transitoires.

Devant ces résultats très prometteurs, le Tisagenlecleucel (Kymriah[®]) a obtenu l'approbation de la Food and Drug Administration en août 2017, et l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) Européenne en août 2018, dans le traitement des LAL-B réfractaires ou après 2 rechutes ou plus chez l'enfant et l'adulte de moins de 25 ans.

II.3.3. Étude supportive non comparative (ENSIGN)⁶³

L'étude ENSIGN est une étude de phase II multicentrique, réalisée aux Etats-Unis et dont l'objectif principal était d'évaluer le pourcentage de rémission complète au cours des 6 mois après l'administration du Tisagenlecleucel (Kymriah[®]).

Un total de 73 patients a été inclus dans cette étude : 58 ont été traités par Tisagenlecleucel (Kymriah[®]) mais seuls 42 disposaient d'un suivi d'au moins 6 mois, nécessaire à l'analyse du critère de jugement principal. L'absence de traitement par Tisagenlecleucel (Kymriah[®]) était due au décès du patient (n=6) ou à un problème de fabrication du produit (n=5), et 4 patients étaient en attente de réception du traitement. Les principales caractéristiques des patients traités étaient similaires à celles des patients de l'étude ELIANA.

Lors de la dernière analyse de suivi en octobre 2017, le pourcentage de rémission globale (RC + RCi) à 6 mois parmi les patients évaluable était de 69%. Après un délai médian de suivi de 5,9 mois, sur les 29 patients ayant eu une réponse complète, 11 étaient encore en rémission, 9 ont eu une rechute ayant entraîné le décès du patient dans 5 cas et 9 ont été exclus de l'analyse pour avoir reçu un autre traitement. Ces rechutes sont survenues entre 53 et 211 jours après l'obtention de la rémission.

Parmi les patients effectivement traités par Tisagenlecleucel (Kymriah[®]), la médiane de survie sans événement a été de 7,9 mois et la médiane de survie globale de 23,8 mois.

II.3.4. Seattle NCT02028455¹¹

Gardner et al. ¹¹ ont publié les résultats d'un essai mené à Seattle, incluant 45 patients parmi lesquels 43 ont pu recevoir une injection de CAR-T cells anti-CD19 portant la molécule de costimulation 4-1BB, comprenant en proportion un pour un des lymphocytes TCD4 et TCD8, après chimiothérapie de lymphodéplétion par Cyclophosphamide seul ou associé à la Fludarabine. Le taux de réponse moléculaire complète était de 89% 21 jours après l'injection. 11 patients ont ensuite été allogreffés.

II.3.5. MSKCC NCT01860937⁶⁸

Enfin en 2019, Curran et al. ont publié les résultats préliminaires d'un essai prospectif multicentrique, incluant 23 patients âgés d'1 an à 22,5 ans et traités au Memorial Sloan Kettering avec des CAR-T cells anti-CD19 possédant le domaine de co-stimulation CD28. 75% des patients présentent une rémission complète avec reconstitution hématologique incomplète à 28 jours post-injection, et 67% ont une maladie résiduelle négative. De nouveau, la majorité des patients répondeurs ($\approx 83\%$) ont bénéficié d'une allogreffe à la suite de l'injection de CAR-T cells. Les résultats finaux de cette étude ne sont pas encore publiés.

Tableau 1. Principaux résultats d'études prospectives publiées.

SRC : syndrome de relargage cytokinique ; gRV : gamma retrovirus ; LV : lentivirus ; RC : rémission complète ; NC : non communiqué ; EC : en cours. Les rechutes CD19-négatives sont exprimées en pourcentage du nombre de rechutes total.

Centre Essai clinique (référence)	Patients inclus / patients injectés	Molécule de costimulation	Vecteur	Type de lymphocytes T	Réponse	Devenir	Rechutes	Rechutes CD19- négatives	SRC et événements neurologiques
NCI NCT01593696 ⁶⁵	21/21	CD28	gRV	Non sélectionnés	67% RC à 28 jours	A 9,7 mois OS = 51,6%	14 rechutes	14%	SRC : 14% Évènements neurologiques : 29%
ELLANA NCT02435849 ¹⁰	97/79	4-1BB	LV	Non sélectionnés	82,3% RC à 3 mois	Estimée à 18 mois : EFS : 66% OS : 70%	19 rechutes	69%	SRC : 77% Évènements neurologiques : 40%
ENSIGN ⁶³	73/58	4-1BB	LV	Non sélectionnés	69% RC à 6 mois	Estimée à 12 mois : EFS : 44% OS : 62,6%	9 rechutes (sur 29 patients ayant des données analysables)	NC	SRC : 81% Évènements neurologiques : 31%
Seattle NCT02028455 ¹¹	45/43	4-1BB	LV	Ratio CD4/CD8 : 1	89% RC à 21 jours	Estimée à 12 mois : EFS : 50,8% OS : 69,5%	18 rechutes Suivi médian : 9,6 mois	39%	SRC : 93% Évènements neurologiques : 49%
MSKCC NCT01860937 ⁶⁸	49/23	CD28	gRV	Non sélectionnés	75% RC à 28 jours	EC	EC	EC	SRC : 80% Évènements neurologiques : 72%

II.3.6. Essais cliniques en cours

II.3.6.1. CASSIOPEIA CCTL019G2201J : Essai de phase II^{63,69}

L'essai CASSIOPEIA est une étude de phase II, multicentrique, à un seul bras, ouverte, visant à déterminer l'efficacité et la sécurité du Tisagenlecleucel (Kymriah[®]) chez 140 patients en pédiatrie et jeunes adultes, atteints de LAL-B de haut risque, qui ont reçu un traitement de première ligne et présentant une maladie résiduelle minimale (MRD) positive à la fin du traitement de consolidation.

II.3.6.2. OBERON CCTL019I2301 : Essai de phase III^{63,70}

L'essai OBERON est un essai de phase III, randomisé, ouvert et multicentrique, qui consiste à comparer le Tisagenlecleucel (Kymriah[®]) vs le Blinatumomab (Blinicyto[®]) ou l'Inotuzumab ozogamicine (Besponsa[®]) chez 240 patients adultes atteints de LAL-B récidivante ou réfractaire, avec pour critère principal, la survie à long terme de ces patients.

II.4. Perspectives de l'utilisation des CAR-T cells dans l'arsenal thérapeutique des LAL-B

Devant les taux de réponse très importants secondaires à l'administration de CAR-T cells dans les LAL-B CD19-positives chez les patients de moins de 25 ans, la place des CAR-T cells anti-CD19 reste plus que jamais à définir. Les essais en cours, précédemment décrits, montreront s'il est envisageable de les utiliser dans les 1^{ères} rechutes de haut risque, afin d'éviter le recours à une GCSH allogénique, pourvoyeuse d'effets secondaires graves à court et à long terme. La place de l'allogreffe de moelle par rapport à l'administration des CAR-T cells est donc discutée. En effet, la survie des patients traités par CAR-T cells ne diffère pas selon qu'ils aient reçu une GCSH au préalable ou pas¹¹. Le traitement par CAR-T cells permettrait soit d'obtenir une maladie résiduelle négative, facteur prédictif d'un meilleur succès de la greffe, soit de se passer d'une GCSH. De même, les CAR-T cells pourraient trouver leur place en 1^{ère} ligne pour les LAL-B réfractaires et de haut risque, à la place d'une chimiothérapie intensive prolongée.

Pour envisager ces indications, il est cependant primordial de confirmer les résultats initiaux en termes d'efficacité, avec un plus grand nombre de patients traités et un suivi prolongé, et de comprendre et maîtriser les effets secondaires spécifiques liés aux CAR-T cells.

Il est également indispensable d'améliorer leur accessibilité. En effet, les CAR autologues ont l'inconvénient de requérir la présence d'un nombre suffisant de lymphocytes T chez le patient ainsi qu'un temps d'ingénierie parfois trop long et des coûts de production considérables. Ainsi, les CAR-T cells allogéniques permettraient une meilleure accessibilité, une diminution des délais et des coûts de production.

II.5. Toxicité rapportée chez l'enfant et le jeune adulte

Les principales toxicités rapportées chez l'enfant après injection de CAR-T cells anti-CD19 peuvent être classées en 2 groupes : aiguës ou à long terme.

Les toxicités aiguës les plus fréquentes sont le syndrome de relargage cytokinique (SRC) dans plus de 70% des cas et la survenue d'un évènement neurologique dans 28 à 70% des cas¹⁰. Ces effets indésirables majeurs peuvent engager le pronostic vital du patient, bien qu'ils soient la plupart du temps réversibles, soit après traitement spécifique (SRC), soit spontanément (évènement neurologique).

Le SRC se manifeste par une hyperthermie élevée, un syndrome pseudogrippal, une hypotension, une hypoxie, une tachycardie, pouvant conduire à une défaillance multiviscérale⁷¹. Il est dû à la sécrétion, par les CAR-T cells et les cellules de l'environnement tumoral, de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IFN- γ , IL-1, -2, -6...), en réponse à l'activation des CAR-T cells. Ces cytokines pro-inflammatoires sont à l'origine du recrutement en cascade de différentes cellules de l'immunité innée et adaptative. Une tempête cytokinique excessive peut conduire à une hyperperméabilité capillaire pouvant être à l'origine d'un œdème cérébral, d'une insuffisance cardiaque ou d'une atteinte rénale aiguë. L'emballement de la réponse immunitaire peut être provoquée par l'activation de cellules immunitaires par de faibles niveaux d'antigènes reconnus par les CAR exprimés sur d'autres tissus : la toxicité est alors dite « on target/off tumor », ou peut aussi résulter de la reconnaissance de structures présentant un mimétisme antigénique avec l'antigène tumoral, par réaction croisée : la toxicité est alors

dite « off target ». La lyse massive et rapide des cellules tumorales peut donc également conduire à une toxicité. Le SRC doit être rapidement pris en charge par des soins de support et thérapeutiques spécifiques, tels que l'utilisation d'un anti récepteur de l'IL-6, le Tocilizumab, associé ou non à une corticothérapie.

Les événements neurologiques peuvent se manifester de manières très diverses sous forme de céphalées, encéphalopathies, crises convulsives... Ils sont le plus souvent associés à un SRC et pris en charge par traitement spécifique du SRC et corticothérapie.

L'aplasie B est une toxicité à long terme des CAR-T cells, liée au choix de la cible CD19, avec la survenue d'effet « on target/off tumor ». Celle-ci persiste tant que les CAR-T cells sont présents, et doit conduire à une supplémentation en immunoglobulines polyvalentes et une prophylaxie anti-infectieuse⁴⁹.

Enfin, à l'heure actuelle, aucun cas de mutagénèse insertionnelle ou cancer secondaire imputable à la thérapie génique et cellulaire n'a été décrit. Le législateur a prévu un suivi de 15 ans pour tous les patients traités, dans cette optique.

II.6. Mécanismes d'échappement au traitement par CAR-T cells anti-CD19

Les LAL-B sont les hémopathies malignes les plus courantes en pédiatrie. Bien que le taux de survie globale (OS) à 5 ans soit actuellement de 80-90 % chez les enfants, les LAL-B récidivantes et/ou réfractaires (R/R) restent l'une des principales causes de décès par cancer en pédiatrie⁵³. La thérapie par CAR-T cells anti-CD19 a donné des résultats prometteurs dans le traitement de ces hémopathies. De nombreux essais cliniques ont montré qu'une rémission complète de 70 à 90 % peut être obtenue chez les patients pédiatriques et les jeunes adultes. Cependant, environ 35% des patients rechutent après un traitement par CAR-T cells¹⁰. Il existe deux mécanismes de rechute post-CAR-T cells dans la LAL-B : les rechutes CD19-positives et les rechutes CD19-négatives, ces dernières représentant la majorité des rechutes décrites (≈ 70% des cas dans l'étude ELIANA). En ce qui concerne la rechute CD19-positive, le mécanisme clé réside dans la faible persistance des cellules CAR-T. L'antigène CD19 est toujours présent à la surface des cellules leucémiques et peut être détecté par cytométrie en flux⁷². Pour les rechutes CD19-négatives, le CD19 est absent, ce qui conduit à des tumeurs échappant à la reconnaissance et à l'élimination par les CAR-T cells, malgré leur persistance¹⁰.

Récemment, Ruella et al. ont mis en évidence qu'une altération de la signalisation des récepteurs de mort cellulaire dans les cellules leucémiques, provoque une résistance aux CAR-T cells. Ce mécanisme semble reposer sur deux phases : une résistance initiale à la mort induite par le CAR, suivie d'une altération progressive de la fonction des CAR-T cells. Cette dernière est associée à une cytotoxicité défailante des cellules CAR-T due à une altération de leur expansion, à une réduction de la production de perforine et de granzyme et à une diminution de la sécrétion de cytokines au fil du temps. Il s'agirait donc d'un nouveau mécanisme de résistance aux CAR-T cells, indépendant de l'antigène ciblé⁷³.

Ainsi, il est crucial de comprendre les mécanismes qui sous-tendent les rechutes, afin de les prévenir au mieux, et le cas échéant, d'orienter les traitements admissibles après CAR-T cells ; ces alternatives restant néanmoins très limitées.

II.6.1. Les rechutes CD19-positives

Après injection, les CAR-T cells présentent une expansion, dont le pic se situe entre J7 et J11 après l'administration, et sont censés persister au long cours. En pratique, la persistance de ces cellules CAR-T est corrélée à une aplasie B, elle-même reliée à la persistance de la rémission dans les LAL-B. Une rechute CD19-positive est donc généralement due à une persistance limitée, une faible puissance ou une faible réponse aux CAR-T cells chez les patients^{72,74}. Par exemple, dans l'étude de phase II ELIANA, la durée médiane de détection du Tisagenlecleucel (Kymriah®) dans le sang a pu être évaluée sur 80% des patients, et était de 168 jours (de 20 à 617 jours). De plus, 83 % des patients présentaient une aplasie B à six mois post-injection. Ainsi les CART-19 sembleraient disparaître dans les 6 mois chez 15 à 20 % des patients¹⁰.

Cette perte des CAR-T cells circulants est donc associée à un risque accru de rechute, et pourrait s'expliquer par divers mécanismes listés ci-dessous.

II.6.1.1. Domaine de co-stimulation du CAR

Le domaine de co-stimulation du CAR influence leur persistance. Les études précliniques rapportées par Zhao et al. ont montré que les CAR contenant un domaine co-stimulateur 4-1BB possèdent une plus grande persistance que ceux contenant un domaine co-stimulateur CD28²⁹.

II.6.1.2. Origine du fragment variable du CAR

Le fragment variable du CAR, d'origine murine, peut entraîner un rejet immun et donc conduire à l'épuisement des CAR-T cells. Certaines études ont ainsi évalué l'utilisation de CAR-T cells humanisées, afin de réduire l'immunogénicité du scFv⁷⁵, et montrent des résultats encourageants. Dans une première étude sur les CAR-T cells anti-CD19 humanisées (CTL119) chez les enfants et les jeunes adultes atteints de LAL-B R/R ; 64% des patients ayant déjà reçu un traitement par CART-19 murins qui s'est avéré inefficace (perte de l'aplasie B, rechutes CD19+, absence de réponse) et 100% des patients n'ayant jamais reçu de CAR-T cells, ont présenté une rémission complète, avec un suivi médian de 4,2 mois⁷⁶.

II.6.1.3. Le phénotype de départ des cellules T des patients

Le phénotype de départ des cellules T des patients jouerait un rôle crucial sur leur pronostic.

En effet, comme évoqué précédemment, les CAR-T cells issues de lymphocytes T moins différenciés (T central mémoire, Tcm), auraient une meilleure capacité proliférative, une longévité plus longue, et permettraient ainsi une efficacité plus importante des protocoles de transfert cellulaire adoptif. Ces sous populations lymphocytaires T peuvent être sélectionnées en culture avant transduction, grâce au cocktail de cytokines utilisé. Le rapport CD4/CD8 dans le produit final peut également être ajusté^{23,37,38}.

Dans un essai clinique conduit par l'équipe de Gardner et al.^{11,77}, 43 patients, enfants et jeunes adultes, ont été inclus, traités par CAR-T cells et classés en non répondeurs (échec précoce du traitement, défini par une absence de rémission ou une progression de la maladie malgré la persistance des CAR-T cells), et en répondeurs (MRD négative à 63 jours de suivi). L'équipe a mis en évidence que la proportion de lymphocytes T CD8 et CD4 exprimant LAG-3 et PD-1, tous deux inhibiteurs de points de contrôles immunitaires, était significativement plus élevée chez les non répondeurs. De plus, le nombre de cellules CAR CD4-positives et CAR CD8-positives, était nettement plus élevé au pic d'expansion des CAR-T cells, chez le groupe répondeur. Le nombre de LT CD8-positifs exprimant TNF- α était également inférieur dans le groupe non répondeur, ce qui suggère qu'une augmentation de la proportion des cellules exprimant LAG-3 et une diminution de la capacité à sécréter des cytokines après stimulation, peuvent produire des CAR-T cells ayant un pouvoir anti-leucémique réduit, entraînant ainsi une rechute CD19-positif.

II.6.2. Les rechutes CD19-négatives

Les différents essais cliniques ont montré que 10 à 20% des patients développent des rechutes CD19-négatives, survenant dans un délai inférieur à 1 an suivant l'administration de CAR-T cells anti-CD19. Ces rechutes peuvent s'expliquer par divers mécanismes⁷⁴ (Figure 9).

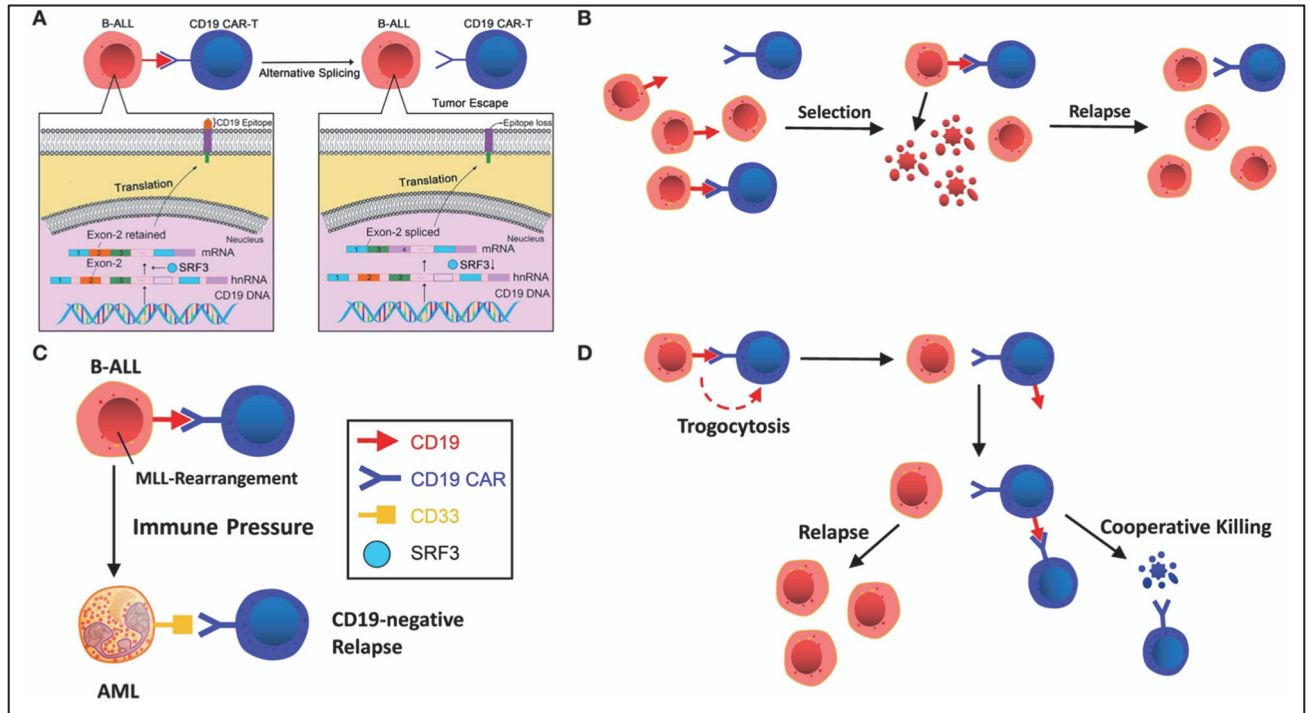


Figure 9. Principaux mécanismes expliquant les rechutes CD19-négatives⁷⁴

- (A) Mécanisme d'épissage alternatif entraînant la perte de l'exon 2 du CD19. La délétion du gène CD19, le décalage du cadre de lecture et les mutations de l'exon 2 ont entraîné la perte de l'épitope du CD19 reconnu par les CAR-T cells. Le faible niveau de SRSF3, facteur d'épissage ayant pour fonction de retenir l'exon 2, est la principale raison de cette perte.
- (B) Sélection par pression immunitaire. Un petit nombre de cellules tumorales CD19 négatives préexistantes échappent à la reconnaissance des CAR-T cells et sont transformées en clones dominants sous un stress thérapeutique sélectif.
- (C) Switch de lignée induite par la pression immunitaire. Les CAR-T cells induisent une reprogrammation cellulaire et une différenciation des cellules pré-B non ciblées.
- (D) Trogocytose et mise à mort coopérative. La perte d'antigène cible sur les cellules leucémiques et son acquisition sur les CAR-T cells entraînent une lyse fratricide et un épuisement de ces CAR-T cells.

II.6.2.1. Mutation du gène CD19

Le gène du CD19 contient 15 exons, parmi lesquels les exons 1 à 4 codent pour les domaines extracellulaires, et les exons 5 à 15 pour les domaines transmembranaires. En particulier, l'exon 4 code l'épitope de liaison FMC63 des CAR-T cells⁷⁸. Plusieurs groupes ont tenté d'identifier les mécanismes de la perte du CD19.

Ainsi, Sotillo et al.⁷⁹ ont analysé 5 modèles de xéno greffes⁸⁰ avec des cellules issues de patients ayant présenté des rechutes CD19-négatives, dans des souris immunodéficientes NOD/SCID/ $\gamma c^{-/-}$ (NSG). L'équipe a montré des pertes d'hétérozygotie dans le gène codant le CD19, des décalages du cadre de lecture et des mutations faux sens dans l'exon 2, étant à l'origine de la perte du CD19 à la surface des cellules tumorales. L'équipe a également mis en évidence la présence d'isoformes non fonctionnelles du CD19 dépourvues d'exon 2 (Δ exon2), dans les cellules leucémiques responsables de la rechute du patient (Figure 9A). L'exon 2 est indispensable au maintien de l'intégrité de l'épitope de liaison aux CAR-T cells et cette isoforme CD19 Δ exon2 conduit ainsi à l'invisibilité de la cellule tumorale par les CAR-T cells. L'équipe a également constaté, dans les rechutes CD19-négatives, un faible niveau d'expression de SRSF3, qui est un facteur d'épissage dont la fonction est de retenir l'exon 2. Pour rappel, l'épissage alternatif est un mécanisme post-transcriptionnel qui conduit à la production de transcrits d'ARNm alternatifs qui codent des isoformes de protéines structurellement et fonctionnellement différentes. Par conséquent, il enrichit la diversité des protéines et joue un rôle important dans l'identité des tissus et la croissance⁸¹. Toutefois, dans les tumeurs, l'épissage alternatif existe également dans le but de produire des isoformes protéiques associées à la prolifération, l'invasion et la propagation des cellules tumorales, et ainsi échapper à une potentielle thérapie ciblée. L'épissage alternatif du CD19 pourrait donc affecter la signalisation cellulaire et la fonction des cellules B à différents stades de leur maturation, et être l'un des mécanismes conduisant à la mutation du gène CD19. Cependant, des études ultérieures ont montré que la fréquence de l'épissage alternatif du CD19 conduisant à une perte de l'exon 2 était très faible (0-2,7%)⁷⁸. Une faible fréquence similaire de sauts d'exon a également été trouvée dans d'autres gènes, suggérant que l'épissage alternatif serait une coïncidence de la perte de l'antigène CD19, qui doit être confirmée par des études supplémentaires.

Dans une autre étude, Fischer et ses collaborateurs⁸² ont analysé des échantillons de moelle osseuse et de sang périphérique prélevés chez des enfants et des adultes atteints de LAL-B CD19-positif, avant traitement par CAR-T cells. L'équipe a montré la présence, au diagnostic et dans tous les échantillons de l'étude, d'isoformes du CD19 partiellement ou totalement délétées de l'exon 2 (Δ exon2). Ces résultats indiquent que ces isoformes, qui contribueraient potentiellement à la résistance à la thérapie par CAR-T cells (par perte de l'épitope de reconnaissance du CAR), existent au diagnostic initial de la LAL-B CD19-positif, avant tout type de thérapie. De plus, l'équipe a également mis en évidence la détection de cette anomalie dans le groupe contrôle (témoins sains) : ces isoformes ne sont donc pas spécifiques des cellules leucémiques, et il est alors difficile d'affirmer que ces clones Δ exon2 sont les clones tumoraux responsables de la rechute.

Dans cette même étude, Fischer et al. ont également montré une délétion des exons 5 et 6, codant pour les domaines cytoplasmiques et transmembranaires du CD19, après traitement par CAR-T cells. En revanche, aucune de ces anomalies n'avait été observée chez les enfants, avant la thérapie par CAR-T cells. Ces données suggèrent qu'un épissage alternatif peut se produire dans les exons 5 et 6, après CART-19, provoquant ainsi l'échappement de la tumeur.

Néanmoins, d'autres essais cliniques sur un nombre suffisant de patients sont nécessaires pour déterminer si la rechute résulte d'un épissage alternatif ou d'une sélection immunitaire.

Dans une étude plus récente, Asnani et al.⁸³ ont montré une rétention de l'intron 2 du gène CD19 dans les cellules leucémiques CD19-négatives, conduisant à la présence d'un codon stop. Ce transcrit non fonctionnel code pour une protéine CD19 tronquée, et serait également à l'origine de résistance au traitement par CART-19, par perte de l'épitope de liaison aux CAR-T cells.

Enfin, dans leur étude, Orlando et ses collaborateurs⁷⁸ ont analysé 12 patients présentant une rechute CD19-négative après une thérapie par CAR-T cells. L'équipe a observé que chaque patient présentait au moins une mutation, insertion ou délétion, dans les exons 2 à 5 du CD19, entraînant ainsi un décalage du cadre de lecture, responsable de la synthèse d'une protéine CD19 tronquée, non fonctionnelle (Figure 10). Aucune mutation dans d'autres gènes des cellules B, tels que CD22, CD20, CD10, CD34, CD38 et CD45, n'a été mise en évidence ; signifiant que l'incidence des mutations retrouvée dans le gène CD19 est un phénomène spécifique. Cette étude a également montré une perte d'hétérozygotie acquise lors de la rechute chez 8 des 9 patients ayant des données analysables. Ces résultats suggèrent que les mutations

homozygotes ou bialléliques du CD19 sont une des sources principales de perte du CD19 à la surface des cellules leucémiques et donc de résistance acquise aux CAR-T cells anti-CD19.

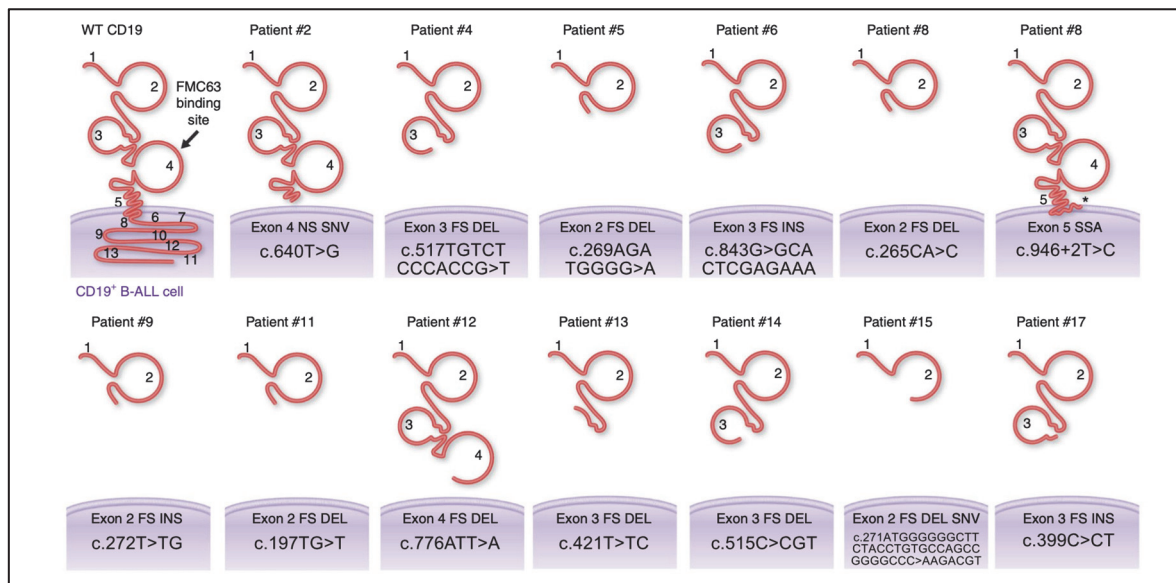


Figure 10. Structure de la protéine CD19 "sauvage" et des protéines CD19 mutées prédites chez les patients en rechute CD19-négative⁷⁸

II.6.2.2. Sélection de clones CD19-négatifs par pression immunitaire

D'une autre manière, la résistance acquise des cellules tumorales à l'immunothérapie par CART-19 peut s'expliquer par la théorie de sélection naturelle de type Darwinienne, de clones leucémiques CD19-négatifs préexistants. Cette thérapie ciblée détruit les cellules tumorales CD19-positives, et transforment ainsi les clones tumoraux non ciblés CD19-négatifs en clones dominants, responsables de la rechute (Figure 9B).

Dans leur étude, Grupp et al.⁸⁴ ont mis en évidence un cas de rechute CD19-négative chez une patiente de 10 ans, 2 mois après avoir reçu une administration de CART-19. Ces cellules leucémiques CD19-négatives possèdent le même réarrangement V(D)J (Variable (Diversity) Joining) que celles CD19-positives présentes au diagnostic, témoignant ainsi d'une origine tumorale commune. De plus, l'équipe a détecté par cytométrie en flux, environ 7% de cellules CD19-négatives avant CART-19, après avoir pré-sélectionné les cellules vivantes CD45-positives, SSC faible, et CD34-positives. Ainsi, ce petit nombre de clones CD19-négatifs préexistants avant la thérapie par CAR-T cells pourrait être responsable de la rechute ultérieure CD19-négative par pression de sélection. Néanmoins, cette analyse n'excluait pas certaines cellules non leucémiques telles que les myéloblastes, et ces clones potentiels ne formaient pas

un cluster clairement défini. Une analyse par biologie moléculaire pour valider de manière convaincante la présence de cellules leucémiques CD19-négatives avant injection de CART-19 paraît donc essentielle.

II.6.2.3. Switch de lignée de la LAL en LAM

Le gène MLL est fréquemment impliqué dans les translocations chromosomiques que ce soit dans les LAL, les LAM et les leucémies biphénotypiques (lignée mixte). Les réarrangements MLL sont présents dans plus de 70 % des leucémies de l'enfant, quelle que soit la lignée.

Dans les LAL avec réarrangement du gène MLL, un switch après traitement par CAR-T cells entre la lignée leucémique lymphoïde et la lignée leucémique myéloïde a été observé chez deux patients⁸⁵ (Figure 9C). A la rechute, les blastes avaient un phénotype myéloïde et n'exprimaient plus le CD19. Les blastes myéloïdes présents lors de la rechute pourraient être dus à la reprogrammation des cellules suite à une dédifférenciation des lymphocytes B ou à une différenciation des lymphocytes pré-B non ciblés ; à la sélection clonale, sous la pression thérapeutique des CAR-T cells, de blastes myéloïdes préexistants en petites quantités ; ou encore à des changements dans le microenvironnement tumoral orientant le changement de lignée des cellules leucémiques. En outre, les deux patients ont développé un grave syndrome de relargage cytokinique (SRC). Or, il a été prouvé que la gravité du SRC est fortement associée à l'IL-6^{71,86}, qui est un facteur crucial de différenciation myéloïde dans les LAL-B avec réarrangement MLL t(4;11)^{87,88}. Par conséquent, des niveaux élevés de cytokines, et notamment d'IL6, pendant le SRC pourraient être favorables à la différenciation myéloïde des clones leucémiques lymphoïdes et à la croissance de ces derniers⁸⁹.

Un autre cas de changement de lignée a été décrit chez un patient atteint de LAL-B avec réarrangement de KMT2A, trois ans après le traitement par CAR-T cells⁹⁰.

Ces données suggèrent ainsi que la prudence doit être de mise dans le traitement par thérapie ciblée anti-CD19 des patients atteints de LAL-B avec réarrangement MLL ou KMT2A.

II.6.2.4. Trogocytose : lyse fratricide et exhaustion des cellules CAR-T

Récemment, l'équipe de Michel Sadelain a identifié, in vitro, un nouveau mécanisme de résistance, par lequel les CAR-T cells, via un mécanisme de trogocytose, pourraient capter le CD19 des cellules tumorales (Figure 9D). Cette trogocytose est responsable non seulement, d'une perte d'antigène cible sur les cellules leucémiques et de son acquisition sur les cellules T, entraînant une lyse fratricide et un épuisement de ces CAR-T cells⁹¹.

II.6.2.5. Cas unique d'une résistance causée par la transduction d'une cellule B leucémique

Ruella et al. ont rapporté un cas unique de rechute CD19-négative, causée par la transduction accidentelle d'une cellule B leucémique par un CAR⁹². Il s'agit d'un patient de 20 ans, atteint de LAL-B en troisième rechute, qui a participé à l'essai de phase I (NCT01626495) visant à évaluer la sécurité du Tisagenlecleucel (Kymriah®) dans les LAL-B du jeune adulte.

Quasiment 9 mois après l'injection de CAR-T cells, une rechute franche a été mise en évidence par cytométrie en flux, montrant un envahissement médullaire > 90% de cellules leucémiques CD10-positives et CD19-négatives. L'analyse multiparamétrique en cytométrie et par biologie moléculaire, a montré que des cellules leucémiques CAR+ étaient à l'origine de la rechute. Le produit d'aphérèse a été analysé, afin de comprendre la survenue et les conséquences de l'expression des CAR sur les cellules leucémiques. Les réarrangements V(D)J identifiés sur les cellules avant le traitement par CAR-T cells étaient identiques à ceux identifiés lors de la rechute, indiquant qu'il s'agit donc du même clone leucémique responsable de la rechute. L'analyse en single-cell a permis de montrer qu'une seule cellule leucémique avait été transduite par 2 lentivirus, intégrés à 2 sites différents. L'hypothèse à l'origine de la rechute chez ce patient serait donc une transduction lentivirale des CAR sur un blaste leucémique présent dans le produit d'aphérèse. Cette cellule leucémique transduite, possède un avantage sélectif lui permettant de survivre durant le processus de production, de persister au cours du temps chez le patient et d'être responsable de sa rechute 9 mois après l'infusion.

Pour expliquer l'absence d'expression de CD19 à la surface des cellules leucémiques, des expériences in vitro ont été réalisées avec des lignées cellulaires de LAL-B (NALM6)

transduites par les CAR. Ces dernières ont révélé un masquage d'épitope par l'interaction en cis du CAR et de la protéine CD19 présente à la surface des cellules leucémiques, rendant ainsi le CD19 indétectable par cytométrie en flux et invisible pour les cellules CAR-T (Figure 11).

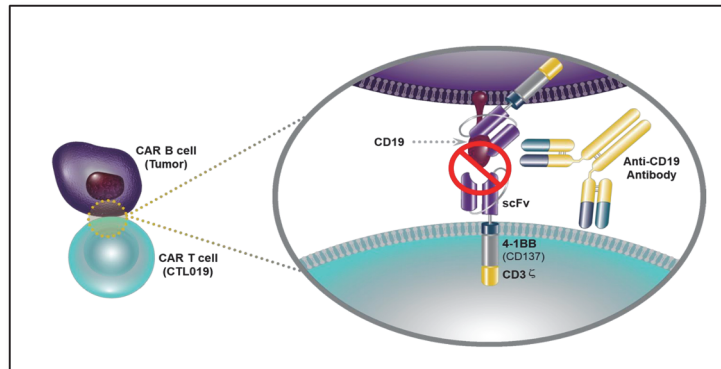


Figure 11. Modèle du masquage de l'épitope CD19⁹²

Ce type de rechute est un cas exceptionnel, puisqu'aucun autre cas d'expression de CAR à la surface des cellules tumorales n'a été retrouvé à ce jour.

OBJECTIF DU TRAVAIL

Comme évoqué précédemment, les LAL-B récidivantes et/ou réfractaires (R/R) restent l'un des principaux enjeux thérapeutiques en pédiatrie⁵³. Bien que la thérapie par CAR-T cells anti-CD19 ait donné des résultats prometteurs dans le traitement de ces hémopathies, environ 35% des patients rechutent plusieurs mois après administration de ce traitement¹⁰.

Plusieurs mécanismes d'échappement au traitement par CAR-T cells anti-CD19 ont d'ores et déjà été décrits, mais pour de nombreux patients en rechute, aucun de ces mécanismes n'a pu être identifié. De plus, à ce jour, aucune étude n'a clairement démontré si la thérapie par CAR-T cells est directement responsable de la dysrégulation de la transcription du gène CD19, ou si elle permet l'émergence de clones leucémiques mineurs CD19-négatifs, échappant aux CART-19.

Ainsi, l'objectif de notre étude a été d'évaluer, par single-cell RNA sequencing (scRNA seq), la présence possible de sous-clones leucémiques CD19-négatifs avant le traitement par CAR-T cells. Ces clones minoritaires préexistants pourraient en effet, être à l'origine des rechutes CD19-négatives, par une sélection de type Darwinienne.

DEUXIÈME PARTIE :

Mise en place de l'approche CITE-Seq

Afin de comprendre les mécanismes moléculaires responsables d'une rechute CD19-négative chez un patient atteint de LAL-B CD19-positif traité par CAR-T cells, et de détecter des potentiels clones minoritaires CD19-négatifs préexistants avant cette thérapie, nous avons décidé de mener une analyse single-cell, et avons développé l'approche CITE-seq^{93,94}. Cette approche permet ainsi d'étudier à la fois le profil transcriptomique et immunophénotypique de chaque cellule. Cette technique repose sur l'utilisation d'anticorps (AC) conjugués à un code-barre oligonucléotide (BC). Or, à ce jour, l'accès à ces AC-BC représente une limitation. En effet, la plupart des AC qui intéressent l'équipe étaient soit limités à un type de technologie (typiquement Chromium™ SingleCell 3' Kit⁹⁵), soit non commercialisés. De plus, cette technologie étant en constante évolution, il nous a semblé indispensable de nous affranchir de ces limitations et donc d'entreprendre la validation d'un protocole de couplage AC-BC, dont le schéma général est décrit dans la Figure 12A. Ainsi, pour l'expérience CITE-Seq décrite dans la troisième partie, 4 AC anti-CD45 ont été couplés à des BC-HTO 5' (HTO-A, HTO-B, HTO-C, HTO-D), dont les séquences sont indiquées dans le Tableau S1.

I. Protocole de couplage des anticorps avec leur code-barre oligonucléotide

I.1. Oligonucléotides, anticorps et produits chimiques

Les oligonucléotides-hashtag (HTO) proviennent de Integrated DNA Technologies. L'ester de méthyltetrazine-PEG4-NHS et le trans-cyclooctène-PEG4-NHS abrégés Mtz et TCO respectivement, proviennent de Click chemistry tools.

I.2. Conjugaison anticorps-oligonucléotide

L'anticorps anti-CD45 (clone HI30) fourni par BioLegend a été conjugué de manière covalente et irréversible à un oligo-HTO spécifique selon le protocole de conjugaison de l'iEDDA (*'Inverse electron demand Diels-Alder'*)⁹⁶ disponible sur www.cite-seq.com⁹⁷.

I.2.1. Couplage oligonucléotide & TCO

100nmol d'oligonucléotides contenant en extrémité 5' une amine primaire sont précipités avec 3 volumes d'éthanol 100% puis repris dans 40 µl d'H₂O ; 10 nmol d'oligonucléotides sont prélevés et incubés pendant 30 minutes dans du tampon BBS [50 mM borate, 150 mM NaCl, pH 8,5] contenant du TCO (10 mM) et DMSO (10%). La réaction est stoppée par l'ajout de glycine pH 8.5 (20 mM final). Enfin, les oligonucléotides sont purifiés (élimination des sels) par filtration (colonnes Bio-Rad® Micro Bio-Spin P-6) et centrifugation (4 minutes à 1000 g). Leur concentration est ajustée à ~100 µM avec du BBS, puis sont conservés à -20°C.

I.2.2. Couplage AC & Mtz

Le système de filtration Amicon® Ultra 0,5 mL 30 kDa ou 50 kDa (Merck Millipore) est utilisé pour concentrer et changer le tampon des AC. 50 µg d'AC sont repris dans 45 µL de BBS puis 1,75 µl de Mtz à 2 mM sont ajoutés ; après 30 minutes d'incubation à T°C ambiante, la réaction est stoppée avec de la glycine pH 8.5 (20 mM final). L'échantillon est filtré sur membrane Amicon (30 kDa) et repris dans 50 µl de BBS.

I.2.3. Conjugaison AC & oligonucléotide

L'AC-Mtz est incubé avec le TCO-BC (ratio 1 µg d'Ac : 30 pmol de BC à 4°C pendant 12 heures). Puis, du TCO-glycine à 10 mM (obtenu en mélangeant 10 µl de 100 mM TCO avec 2 µl de Glycine 1 M pH 8,5 et 88 µl d'H₂O) est ajouté (1/10^{ème} du volume réactionnel). Les sels et petites molécules sont éliminés par filtration sur membrane Amicon® 50 kDa puis les AC-BC sont repris dans du PBS. La qualité du couplage et l'élimination de l'excès d'oligonucléotide libre sont vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose (3%) et SDS-PAGE. Typiquement, le gel d'agarose montre que la majorité du BC est couplée à l'AC et que l'étape de filtration sur membrane 50 kDa permet l'élimination efficace des BC libres (Figure 12B). De plus, après conjugaison, les AC libres ne sont plus détectés par SDS-PAGE, contrairement aux AC-BC qui apparaissent sous une forme de bande diffuse, suggérant que le nombre de BC

fixés par AC est hétérogène (Figure 12C). Ainsi, tous les AC testés ont été conjugués avec succès. Les anticorps conjugués aux oligonucléotides (AC-BC) sont conservés à 4°C dans du PBS contenant de l'azide de sodium (0,04 %).

I.2.4. Vérification de la fonctionnalité des AC-BC par FACS

Les AC-BC sont hybridés avec des oligonucléotides biotinylés complémentaires (hybridation : 10 minutes à 37°C, 20 minutes à T°C ambiante puis conservation à 4°C). Puis, différentes quantités de ces duplex (0,1 µg, 0,5 µg et 1 µg) sont incubées avec des lignées cellulaires Jurkat pendant 45 minutes à 4°C. Après lavage au PBS, 10 µg de streptavidine (SAV) couplée au BV421 (BD Biosciences) sont ajoutés (incubation 10 minutes à 4°C). Les cellules sont ensuite analysées par FACS (CANTO II, BD). Un exemple typique de profil FACS obtenu est visible sur la Figure 12D.

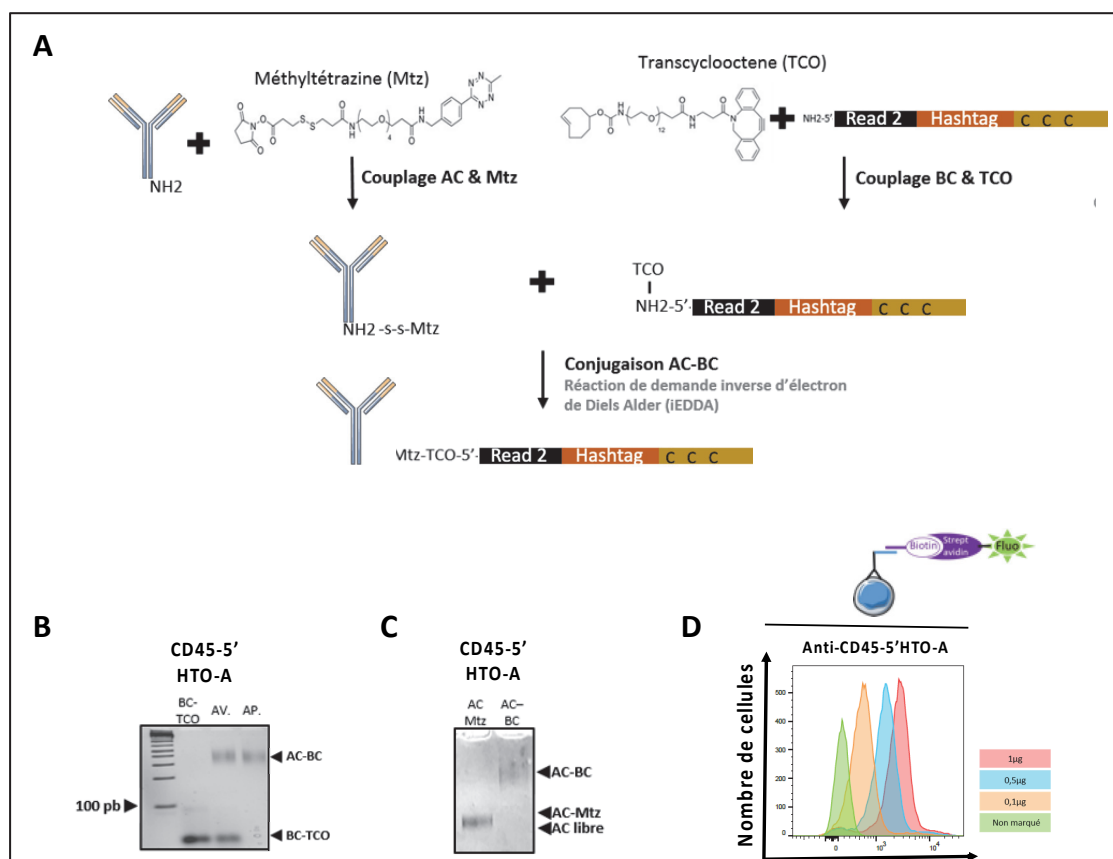


Figure 12. Protocole de couplage des anticorps (AC) avec leur code-barre oligonucléotide (BC) et validation fonctionnelle par FACS

(A) Schéma général de la réaction de conjugaison de l'AC au BC. (B) Gel d'agarose typique d'un des 4 AC-BC avant (AV) et après (AP) purification. (C) Gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) typique d'un AC après couplage à la MTZ puis au BC. (D) Validation fonctionnelle d'un AC-BC par FACS. Des cellules Jurkat en culture ont été marquées par 1µg, 0,5µg et 0,1µg d'AC-BC nouvellement synthétisés, préalablement hybridés avec un oligo-biotinylé complémentaire qui sera détecté par la streptavidine (SAV) couplée à un fluorochrome (BV-421). Les cellules sont ensuite analysées par FACS. Un exemple typique d'histogramme FACS pour la validation de l'AC-HTO 5' Anti-CD45 est montré.

I.3. Protocole CITE-Seq

I.3.1. Préparation des échantillons.

Les cellules triées par FACS ont été marquées avec des anti-CD45 conjugués à des oligo-hashtag (HTO) (Tableau S1), puis ont été isolées en utilisant la technologie Chromium Single Cell 5' de 10XGenomics⁹⁸. En bref, 5000 cellules de chaque population triée ont été regroupées, chargées sur une puce microfluidique contenant les billes (couplées aux code-barres 10XGenomics) et de l'huile. L'appareil Chromium permet la formation d'une émulsion « Gel Bead-in-Emulsion » (GEM), contenant une seule cellule et une seule bille 10XGenomics, qui est alors directement utilisée pour la transcription inverse (RT) (45 minutes à 53°C et 5 minutes à 85°C). Les ADNc obtenus sont purifiés à l'aide de billes magnétiques (Dynabeads MyOne SILANE) puis amplifiés par PCR (45 secondes à 98°C, puis 10 à 12 cycles : 20 secondes à 98°C, 30 secondes à 67°C, 1 minute à 72°C ; puis 1 minute à 72°C). L'utilisation des billes SPRIselect (Beckmann Coulter) (0,6X) et d'un aimant permet de purifier mais aussi sélectionner les ADNc selon leur taille. A cette concentration de 0,6X, les ADNc de l'ARNm (> 300 pb) sont retenus sur les billes SPRIselect alors que le surnageant contient les petits fragments (< 300 pb) provenant des BC des AC. L'ADNc provenant de l'ARNm, fixé sur les billes SPRIselect, est lavé avec de l'éthanol 80% puis élué par 45,5 µL de tampon EB (10XGenomics). 45 µL de cet échantillon serviront à la constitution de la librairie ARNm. Les ADNc des AC-BC HTO, contenus dans le surnageant, sont purifiés avec des concentrations plus élevées de SPRIselect (2X), lavés avec de l'éthanol 80% puis élués avec 40 µl de tampon EB (10XGenomics).

I.3.2. Construction des librairies.

Les librairies ARNm et HTO ont été préparées avec le kit "Single Cell 5' Library & Gel Bead" (10XGenomics) selon les instructions du fabricant.

Construction de la librairie ARNm. 30 µL de mix de fragmentation (10XGenomics) a été ajouté à 20 µL d'ADNc purifié (≈ 50 ng). Après homogénéisation, les ADNc sont fragmentés grâce à un programme adapté : 5 minutes à 32°C, 30 minutes à 65°C. Les ADNc fragmentés sont sélectionnés et purifiés par l'utilisation de billes SPRIselect (Beckmann Coulter) à la

concentration de 0,6X dans un premier temps, puis avec 0,8X de SPRIselect. Ils sont ensuite lavés avec de l'éthanol 80% et élués dans 50,5 µl de tampon EB. 50 µl d'ADNc sont alors incubés (15 minutes à 20°C) avec 50 µl d' 'Adaptator ligation mix' contenant l'ADN ligase et le primer Read 2. Les ADNc sont à nouveau purifiés avec 0,8X de SPRIselect, lavés avec de l'éthanol 80% puis élués dans 30,5 µl de tampon EB. 30 µl d'ADNc sont ensuite amplifiés par PCR (45 secondes à 98°C ; 15 cycles : 20 secondes à 98°C, 30 secondes à 54°C, 20 secondes à 72°C ; puis 1 minute à 72°C) en présence des amorces SI-PCR et d'un 'Chromium i7 sample index' spécifique ; puis de nouveau purifiés grâce aux billes SPRIselect (0,6X puis 0,8X), lavés avec de l'éthanol 80% et enfin élués dans 35 µl de tampon EB.

Construction de la librairie HTO. Les ADNc pour la librairie HTO sont amplifiés avec les amorces SI-PCR et D701_s. Les programmes PCR sont les suivants : 3 minutes à 95°C ; 10 cycles : 20 secondes à 95°C, 30 secondes à 64°C, 20 secondes à 72°C ; puis 5 minutes à 72°C. Les produits de ces deux PCR sont purifiés avec 1,2X de SPRIselect, lavés avec de l'éthanol 80% et élués dans 40 µl de tampon EB.

I.3.3. Contrôle qualité des librairies.

La quantification des librairies se fait par le fluorimètre Qubit®, en utilisant le kit Qubit™ dsDNA HS Assay (ThermoFisher). La taille moyenne des fragments constituant les librairies ARNm et HTO, est définie par le système Agilent 2100 Bioanalyzer : 0,5 à 5 ng de chaque librairie est déposé sur une puce « Agilent Bioanalyzer High sensitivity chip ».

I.3.4. Séquençage.

Les librairies ont ensuite été séquencées en utilisant le séquenceur Next-seq500 (Illumina) et les paramètres suivants, Read1 : 26 cycles, i7 : 8 cycles, Read2 : 57 cycles.

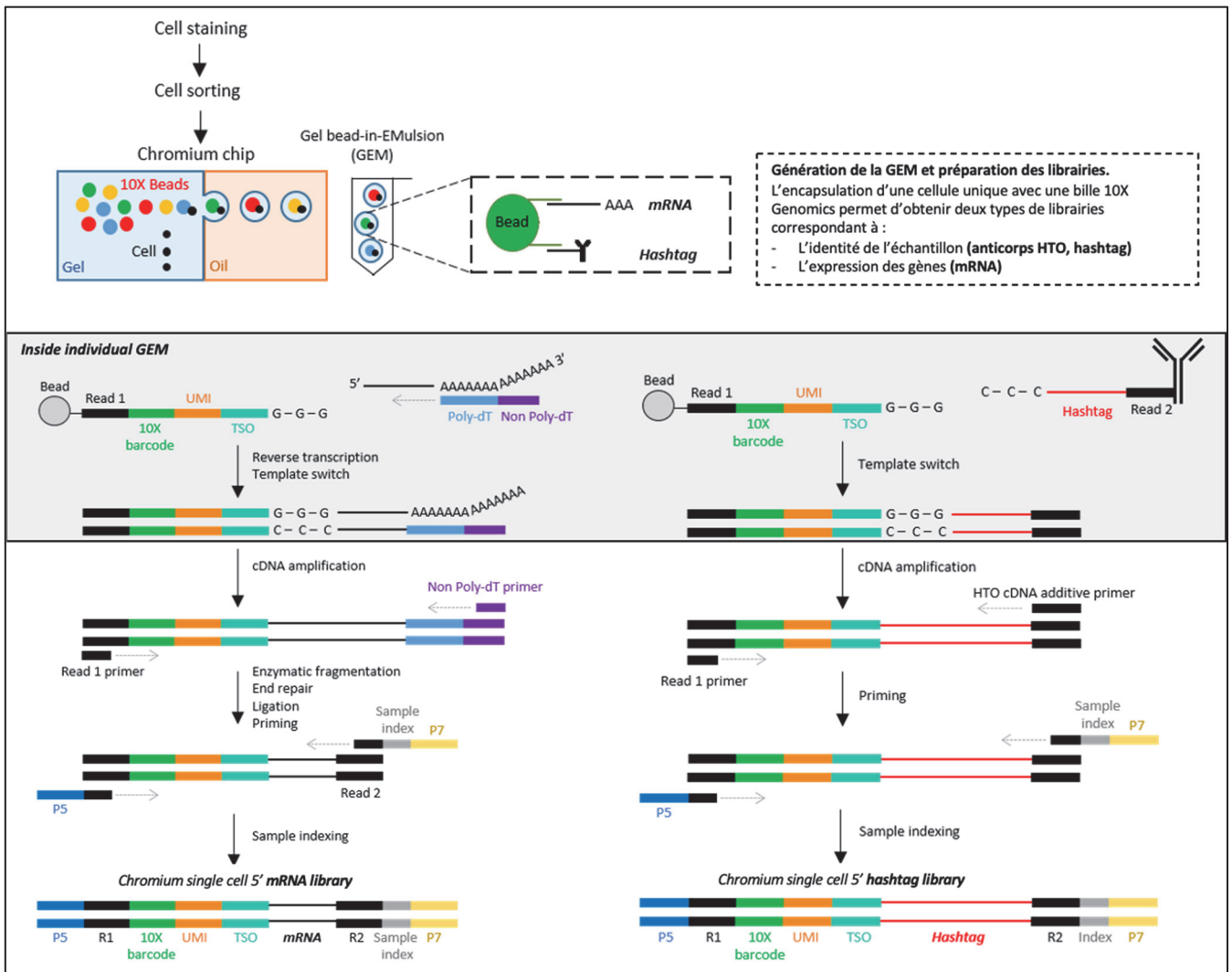


Figure 13. Préparation des bibliothèques 10X pour une expérience CITE-Seq

Après encapsulation d'une seule cellule à l'aide de l'appareil Chromium, la cellule est lysée et les séquences oligonucléotidiques d'intérêt sont hybridées aux code-barres 10XGenomics de la bille et au RT primer. La transcription inverse a lieu à l'intérieur de chaque GEM. Les bibliothèques sont ensuite construites après lyse de la GEM et selon le protocole 10X Chromium Single Cell 5' Library.

TROISIÈME PARTIE :
Article en révision dans
Nature Communications

Résumé : L'une des approches les plus innovantes pour traiter les leucémies aiguës lymphoblastiques B (LAL-B) récidivantes ou réfractaires de l'enfant et de l'adulte jeune, implique l'utilisation de cellules T modifiées génétiquement, de manière à exprimer un récepteur antigénique chimérique (CAR) contre la protéine de surface CD19. Cependant, le taux de rechute chez les enfants et les jeunes adultes traités par CAR-T cells est d'environ 35%, et les rechutes CD19-négatives représentent près de la moitié des cas. Des études récentes ont montré que la négativité du CD19 résulte principalement d'une altération de l'expression de l'ARN messager du CD19. Cependant, aucune étude n'a clairement démontré si la thérapie par CAR-T cells est directement responsable de la dysrégulation de la transcription du CD19, ou si elle permet simplement l'émergence de clones mineurs CD19-négatifs, échappant alors aux CAR-T cells anti-CD19. En utilisant l'approche CITE-seq de 10XGenomics, nous avons étudié les échantillons médullaires, collectés avant et après thérapie par CAR-T cells, d'un patient de 11 ans atteint de LAL-B, ayant rechuté en LAL-B CD19-négative 90 jours après l'administration de CAR-T cells. Nous démontrons chez ce patient, que les cellules leucémiques CD19-négatives expriment une isoforme non fonctionnelle du transcrit CD19 par rétention de l'intron 2, codant ainsi pour une protéine CD19 tronquée et conduisant à l'invisibilité de la cellule tumorale par les CAR-T cells. Par analyses moléculaires et bio-informatiques, nous prouvons que ces cellules tumorales CD19-négatives étaient présentes avant la thérapie par CAR-T cells, et donc que la rechute pourrait résulter d'une sélection de type Darwinienne de rares sous-clones CD19-négatifs préexistants. Ces derniers peuvent être révélés par single-cell RNA sequencing, représentant ainsi un outil utile pour identifier les patients à haut risque de rechute et permettant d'évaluer le risque d'échec de cette thérapie ciblée.

Mots clés : CAR-T cells, leucémie aiguë lymphoblastique B, single-cell, CITE-seq

Pre-existing CD19neg B-ALL subclones underlie CAR-T cell therapy failure.

Authors: Tracy Rabilloud^{†1}, Delphine Potier^{†1}, Saran Pankaew¹, Mathis Nozais¹, Marie Loosveld^{*1,2}, Dominique Payet-Bornet^{*1}

Affiliations:

¹Aix Marseille Université, CNRS, INSERM, CIML, Marseille, France.

²APHM, Hôpital La Timone, Laboratoire d'Hématologie, Marseille, France

*** Corresponding authors:**

Dr Dominique Payet-Bornet email: payet@ciml.univ-mrs.fr

Dr Marie Loosveld email: loosveld@ciml.univ-mrs.fr

†These authors contributed equally

Abstract: Using single-cell RNA sequencing (scRNAseq), we investigated B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) patient who relapsed as a CD19neg B-ALL after treatment with anti-CD19 chimeric antigen receptor (CAR)-T cell therapy. We demonstrate that CD19neg leukemic cells were present before CAR-T cell therapy and thus that the relapse results from the selection of rare pre-existing CD19neg subclones. Those can be revealed by scRNAseq, raising the possibility to assess the risk of targeted therapy failure.

One of the most innovative approach to treat relapsed or refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) involves the use of adoptive T cells expressing chimeric antigen receptors (CAR-T) against CD19^{1,2}. However, relapse rate of B-ALL in children and young adults treated with CAR-T therapy is $\approx 40\%$ and CD19-negative relapses account for almost half of the cases^{1,3}. Recent studies showed that CD19 negativity results mainly from impaired expression of CD19 mRNA (through de novo frameshift/missense CD19 mutations, alternatively spliced CD19 mRNA species and hemizygous deletions spanning the CD19 locus)⁴⁻⁷. However, no study has clearly demonstrated whether CAR-T cell therapy is directly responsible of CD19 transcription dysregulation or simply allows the emergence of minor

CD19neg clones escaping CD19 targeted therapy. Herein, we assessed the possible presence of CD19neg B-ALL subclones before CAR-T cell treatment.

We used single-cell RNA sequencing (scRNAseq) approach to investigate leukemic cells of a B-ALL patient at two-time points; before and after anti-CD19 CAR-T cell therapy. The B-ALL patient underwent a relapse after chemotherapy and CD19pos leukemic cells from BM were harvested (T1-cells = before CAR-T cell therapy) (Fig.S1A). Then, the patient was treated with anti-CD19 CAR-T. After an initial complete remission, the patient experienced a frank relapse, as noted by circulating blasts and a >90% infiltration of CD10posCD19neg leukemic cells in the BM (Fig.S1B) from which cells were harvested (T2-cells = after CAR-T cell therapy). Therefore, we asked whether these CD19neg B-ALL clones were present before CAR-T cell therapy. To address this issue, T1 and T2 samples were sorted according to forward scatter and side scatter, a cell viability marker, CD3 and CD19 surface expression (Fig.1A). We obtained 4 tubes of sorted cells: T1-CD19pos, T1-CD19neg, T2-CD19pos and T2-CD19neg. Each of those samples were marked with a distinct anti-CD45-hashtag oligonucleotide (HTO) antibody⁸ (table S1), then mixed and analyzed by scRNAseq using the 5' 10XGenomics technology⁹ (Fig.1A). After libraries sequencing and data pre-processing, we applied the UMAP non-linear dimensionality reduction method to visualize cell transcriptome heterogeneity¹⁰. UMAP analysis identified six main clusters (Fig.1C). According to various gene markers, we assigned cell type to clusters (Fig.1B-C). Non-B cells, i.e. myeloid and NK cells are located in clusters 2 and 5 respectively. Physiological B-cells are in clusters 3 and 4, while B-ALL cells are in clusters 0 and 1. Sample demultiplexing assigned 1189, 524, 764 and 442 cells to T1-CD19pos, T1-CD19neg, T2-CD19pos and T2-CD19neg samples respectively, and allowed us to visualize sample of origin for each cell on the UMAP. Notably, T1-CD19pos and T2-CD19neg tumoral cells were detected mainly to cluster 0 and 1 respectively (Fig.1D). Those two clusters displayed different expression profiles. The most differentially expressed transcription factor was KLF6 gene, a well-known tumor suppressor gene^{11,12} (Fig.S2). Strikingly, CD19 mRNA transcripts were detected in T2-CD19neg tumoral cells albeit at lower level than in T1-CD19pos tumoral cells (Fig.S3). The analysis of bulk cDNA from T1-CD19pos and T2-CD19neg sorted cells (Fig.1E) shows that T2-CD19neg cells do not express full-length transcripts. We observed that both samples express a previously described⁶ non-functional CD19 transcript retaining intron 2 (Fig. S4). However, in T2-CD19neg cells only this non-functional isoform is expressed, explaining the absence of CD19 protein despite the presence of CD19 mRNA.

Importantly, in the UMAP plot we clearly distinguish in tumoral clusters, 20 cells belonging to T1-CD19neg sample (Fig.1D and Fig. 2A, red dots) indicating that those cells are CD19neg B-ALL. However, as CD19 negativity was defined by FACS during cell sorting, we validated this observation at the molecular level. Thus, the 20 putative CD19neg B-ALL clones were backtracked using their cell identifier 10X barcode, and CD19 mRNA expression was assessed by nested-PCR (Fig.2B). As shown in Fig. 2C, one specific CD19 mRNA band is clearly detected for the 3 positive control cells (CD19pos B-ALL from T1-CD19pos samples), conversely only background levels of various PCR products were observed for negative control cells (CD19neg B-ALL from T2-CD19neg samples). Among the 20 CD19neg B-ALL clones spotted at T1, 10 clones were clearly similar to control CD19neg B-ALL cells (i.e. background level of PCR products and absence of a clear specific CD19 mRNA band) (Fig. 2C). The PCR profile of the remaining 10 clones were ambiguous, as a faint CD19 mRNA band was detected (not shown). Overall, our results demonstrate that CD19neg B-ALL clones were present before anti-CD19 CAR-T therapy, which, per se, is thus not responsible for CD19 mRNA dysregulation.

A previous study suggested the presence of CD19neg B-ALL clones before CAR-T treatment¹³. Yet, in this study CD19neg cells (~7%) were detected by FACS after a gating strategy based on live cells that were CD45pos, SSC low, and CD34pos¹³. Thus, this analysis did not formerly exclude some non-B-ALL cells such as myeloblasts. We attempted to identify by FACS CD19neg B-ALL clones; however, those potential clones represent only 0.03% of live cells and were not clearly clustered (fig. S5) and thus require molecular biology to convincingly validate their leukemic origin.

In conclusion, our study demonstrates that a Darwinian-like selection of pre-existing CD19neg B-ALL cells is a mechanism for CD19neg B-ALL relapse after CAR-T cell therapy. A scRNAseq approach can unambiguously detect minor CD19neg subclones before CAR-T cell therapy and may represents a useful tool to identify patients at high-risk of relapse after CAR-T cell therapy.

References

1. Maude, S. L. et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* 378, 439–448 (2018).
2. Kansagra, A. J. et al. Clinical Utilization of Chimeric Antigen Receptor T Cells in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: An Expert Opinion from the European Society for Blood and Marrow Transplantation and the American Society for Transplantation and Cellular Therapy. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 25, e76–e85 (2019).
3. Gardner, R. A. et al. Intent-to-treat leukemia remission by CD19 CAR T cells of defined formulation and dose in children and young adults. *Blood* 129, 3322–3331 (2017).
4. Orlando, E. J. et al. Genetic mechanisms of target antigen loss in CAR19 therapy of acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* 24, 1504–1506 (2018).
5. Fischer, J. et al. CD19 Isoforms Enabling Resistance to CART-19 Immunotherapy Are Expressed in B-ALL Patients at Initial Diagnosis: *Journal of Immunotherapy* 40, 187–195 (2017).
6. Asnani, M. et al. Retention of CD19 intron 2 contributes to CART-19 resistance in leukemias with subclonal frameshift mutations in CD19. *Leukemia* (2019)
7. Sotillo, E. et al. Convergence of Acquired Mutations and Alternative Splicing of CD19 Enables Resistance to CART-19 Immunotherapy. *Cancer Discovery* 5, 1282–1295 (2015).
8. Stoeckius, M. et al. Cell Hashing with barcoded antibodies enables multiplexing and doublet detection for single cell genomics. *Genome Biol.* 19, 224 (2018).
9. Zheng, G. X. Y. et al. Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells. *Nat Commun* 8, 14049 (2017).
10. Butler, A., Hoffman, P., Smibert, P., Papalexi, E. & Satija, R. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. *Nat. Biotechnol.* 36, 411–420 (2018).
11. Narla, G. KLF6, a Candidate Tumor Suppressor Gene Mutated in Prostate Cancer. *Science* 294, 2563–2566 (2001).
12. Tetreault, M.-P., Yang, Y. & Katz, J. P. Krüppel-like factors in cancer. *Nat Rev Cancer* 13, 701–713 (2013).
13. Grupp, S. A. et al. Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells for Acute Lymphoid Leukemia. *N Engl J Med* 368, 1509–1518 (2013).

Acknowledgements

High-throughput sequencing was performed at the TGML Platform, supported by grants from Inserm, GIS IBiSA, Aix-Marseille Université, and ANR-10-INBS-0009-10. This study was partly supported by research funding from the Canceropôle PACA, Institut National du Cancer and Région Sud. SP received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under the Marie Skłodowska-Curie Grant Agreement No. 713750, and from the Regional Council of Provence-Alpes-Côte d'Azur, A*MIDEX (No. ANR-11-IDEX0001-02). DP received financial support from ITMO Cancer of AVIESAN (Alliance Nationale pour les Sciences de la Vie et de la Santé, National Alliance for Life Sciences & Health) within the framework of the Cancer Plan (project n° C19046S) and from CNRS 'Osez l'interdisciplinarité!' program-'DMATh' project.

Author contributions

TR, DP, ML & DPB performed the experiments, analyzed the data and wrote the manuscript. DP, SP & MN performed bioinformatics analysis. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare no conflict of interest.

Figures

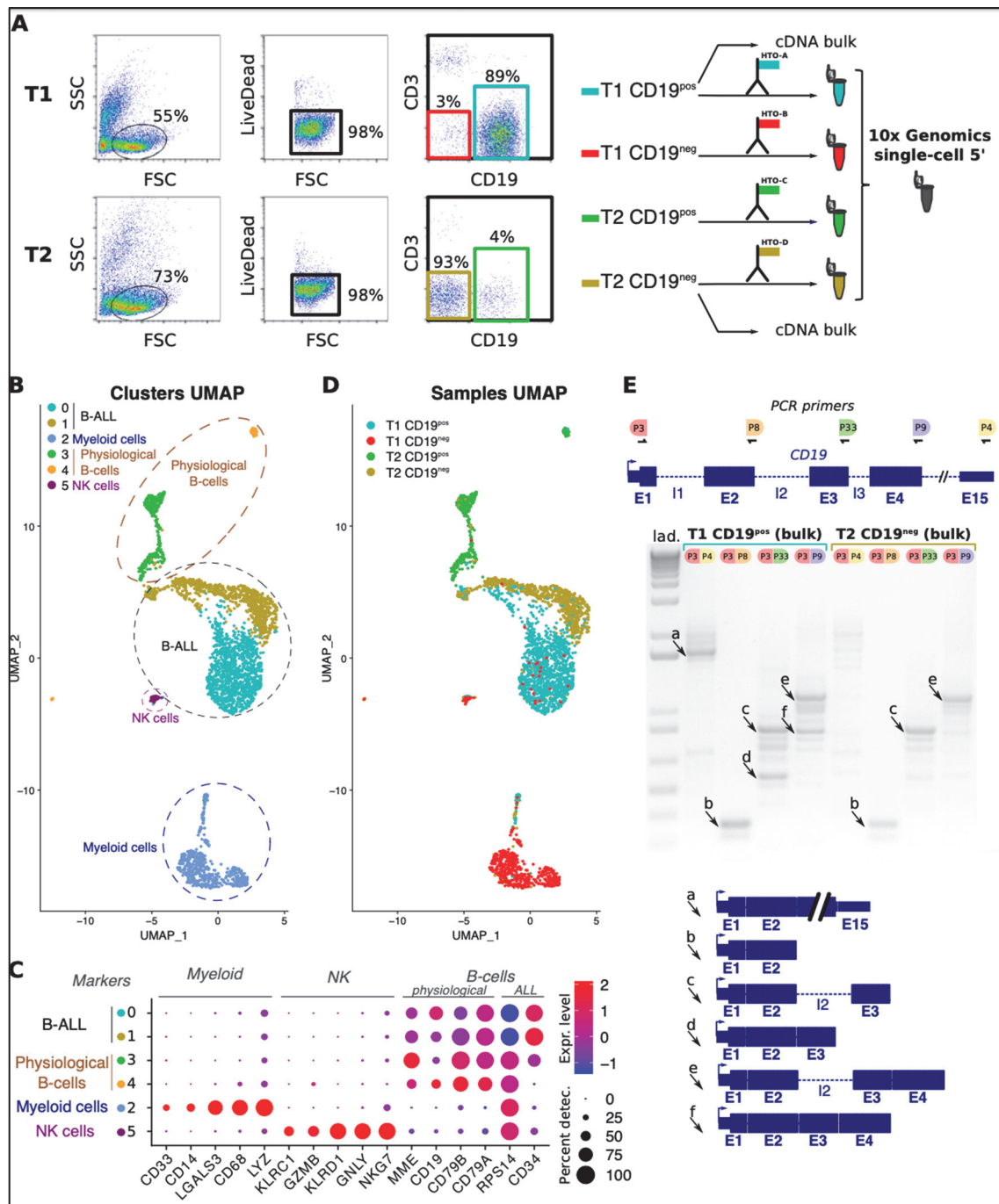


Fig. 1 CD19^{neg} B-ALL relapse following CAR-T therapy

(A) Cell sorting strategy. Cells before (T1) and after (T2) CAR-T treatment were gated according to FSC/SSC profile (left FACS plots). Then, live cells (middle FACS plots) were analyzed according to CD3 and CD19 expression (right FACS plots). Gates of the four sorted subpopulations T1-CD19^{pos}, T1-CD19^{neg}, T2-CD19^{pos} and T2-CD19^{neg} are highlighted in cyan, red, green and gold respectively. Those sorted subpopulations were labelled with a specific anti-CD45-HTO antibody, then multiplexed and analyzed by scRNAseq using the 10X Genomics single-cell 5' technology. Some cells from T1-CD19^{pos} and T2-CD19^{neg} samples were used in bulk to prepare cDNA. (B) UMAP visualization of the 6 main clusters and their corresponding cell types, of T1 & T2 sorted samples. (C) Seurat Dotplot showing the expression level of marker genes in each cluster. Dot size represents the percentage of cell expressing the gene, while dot color represents the average scaled expression level. We used CD34 and RPS14 expression as tumoral markers. Indeed FISH analysis revealed a 5q32 deletion, explaining RPS14 lower expression in B-ALL cells. (D) UMAP visualization of the 4 demultiplexed samples: T1-CD19^{neg}, T1-CD19^{pos}, T2-CD19^{neg}, T2-CD19^{pos}. (E) Agarose gel of CD19 cDNA amplified products using exons-specific primer sets depicted on the top panel. PCR were performed with bulk cDNA from T1-CD19^{pos} cells and T2-CD19^{neg} cells. Lane 'Lad' is the 1 kb DNA size marker. Schematic representations of PCR products indicated by 'a' to 'f' arrows are shown below the gel.

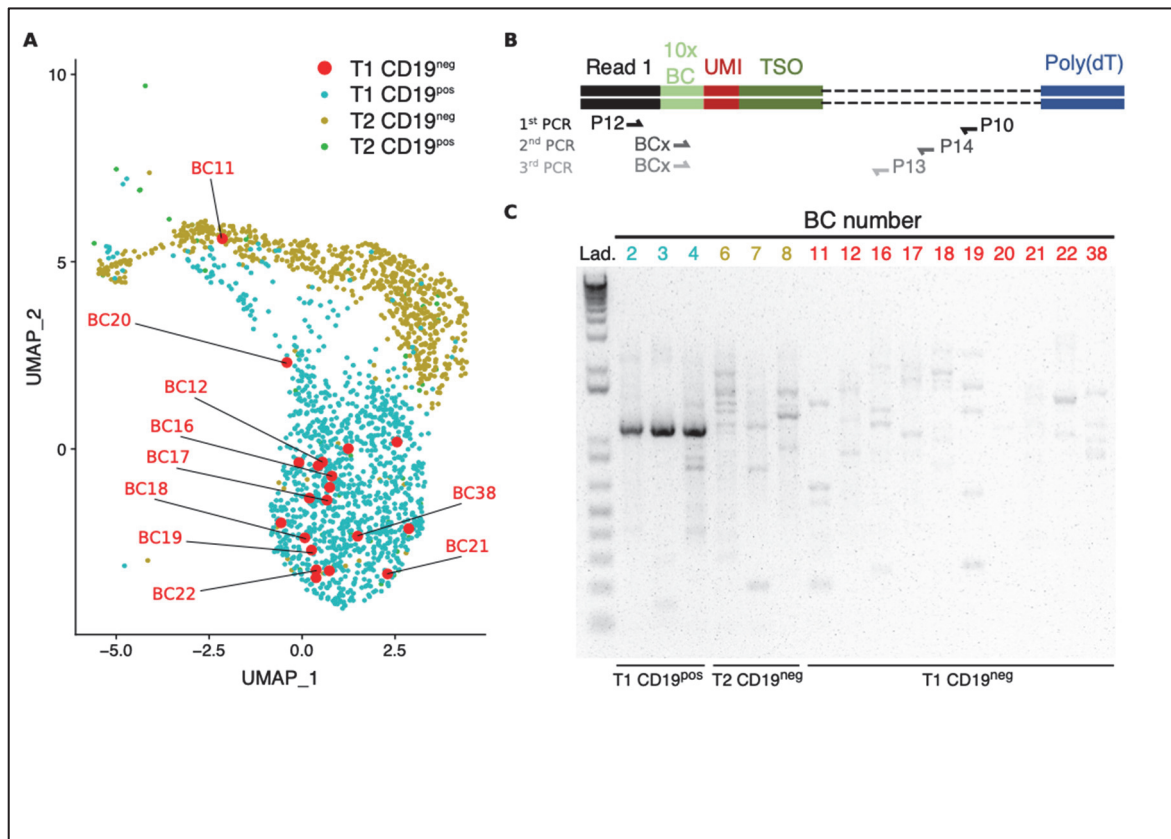


Fig. 2 Detection of CD19^{neg} B-ALL clones before CAR-T treatment.

(A) UMAP plot focused on tumoral cells (clusters 0 and 1) and colored according to sample of origin. The 20 cells from T1-CD19^{neg} samples are highlighted by larger red dots. Sequences of 10X cell barcode (BC) of interest are indicated in Table S1. (B) Nested-PCR strategy to detect CD19 transcript in single-cell. (C) Agarose gel of CD19 cDNA amplified by nested-PCR. Lanes are labelled according to the cell-BC number for which the sample of origin is indicated at the bottom of the gel.

Supplementary information for Pre-existing CD19^{neg} B-ALL subclones underlie CAR-T cell therapy failure.

This PDF includes:

Methods

Supplementary references

Table S1

Figures S1 to S5

Methods

Patient's sample.

Bone marrow (BM) samples were collected from a B-ALL patient before and after CAR-T therapy. Informed consent for use of diagnostic and relapse specimens for future research was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki.

Flow cytometry.

BM samples were tested within 24h of collection. Briefly, following NH₄Cl red blood cell lysis, cells were immunophenotyped using CD45-KrO, CD19-PC7, CD34 ECD, CD10-FITC, CD38-APC, CD58-PC5 and CD66c+123-PE. Data were acquired on Navios cytometer (Beckman Coulter) and analysis was made using Kaluza software (Beckman Coulter). For cell sorting, cells stained with CD19-APC, CD3-PE and LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Invitrogen) were FACS-sorted using FACSMelody™ cytometer (Becton Dickinson).

Antibody-HTO conjugation.

Anti-CD45 antibody (clone HI30) provided by BioLegend was irreversibly conjugated to hashtag oligo (HTO) (sequences shown in Table S1) using the iEDDA click chemistry as previously described¹ and according to the protocol found at www.cite-seq.com.

Single-cell RNA sequencing experiment.

FACS-sorted cells were labelled with anti-CD45 conjugated to hashtag oligos (HTO) (Table S1). Cells were isolated using the Chromium technology from 10XGenomics. Briefly, 5000 cells of each sorted population were pooled, loaded on a Chromium Chip A and droplet-encapsulated with a Chromium controller. Single-cell cDNA synthesis and sequencing libraries were prepared with Single Cell 5' Library & Gel Bead kit (10XGenomics) according to manufacturer's instructions. Libraries were sequenced using a Next-seq500 and the following parameters, Read1: 26 cycles, i7: 8 cycles, Read2: 57 cycles.

ScRNAseq data analysis.

For data preprocessing, mRNA library reads were aligned to the GRCh38 version of the human genome and quantified using CellRanger count (version 3.0.1). Antibody counts for cell hashing were quantified using CITE-seq-count (version 1.4.3, NYGCtech, <https://github.com/Hoohm/CITE-seq-Count>) using default parameters. The produced mRNA and HTO data matrices were imported into R (v3.5.3) and downstream analysis were performed with the Seurat package (v3.0.1)²⁻⁴.

In order to perform sample demultiplexing, hashtag oligos (HTOs) for each cell were normalized using a centered log ratio (CLR) transformation across cells. Cells were demultiplexed using the Seurat HTODemux function, and cell doublets and background empty droplets subsequently removed. Before mRNA expression analysis, we filtered out low quality cells from the mRNA matrix (i.e. cells expressing less than 200 genes or more than 10 % of mitochondrial associated genes). Genes expressed in less than 3 cells were removed. Then, expression raw counts were normalized and scaled using respectively the Seurat NormalizeData and scaleData functions. The top 2000 variable genes were selected (FindVariableFeatures function; selection method = "vst") to perform a dimensionality reduction using the principal component analysis method (RunPCA function) and a UMAP was computed using the 20 first components (RunUMAP function). We used the Seurat graph based clustering algorithm to identify clusters of cells (using 20 dimensions and a coarse grained resolution of 0.1).

Finally, to infer gene regulatory network responsible for clonal transcriptional changes underlying tumoral evolution we applied SCENIC method⁵ using the filtered matrix raw UMI counts.

Reverse Transcription (RT)-PCR

RNA from T1-CD19^{pos} and T2-CD19^{neg} samples were extracted using RNAeasy mini kit (Qiagen) and bulk cDNA was synthesized using High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). Then CD19 transcripts were assessed by PCR using specific primers (Table S1) and Herculase II enzyme (Agilent technologies). The following PCR program was applied: 95°C 1min, 35 cycles (95°C 20 sec, 56°C 20 sec, 68°C 90 sec), 68°C 4min. Sanger sequencing of PCR products was performed by Eurofins Genomics.

Backtracking of CD19^{neg} clones.

Investigation of CD19 cDNA of individual cells was performed by nested-PCRs using amplified 10X barcoded full-length cDNA. Three successive PCR were carried out with Herculase II enzyme (Agilent technologies) and with the following PCR program: 95°C 1min, 20 cycles (95°C 20 sec, 56°C 20 sec, 68°C 90 sec), 68°C 4min (for the 2nd PCR only 15 cycles were performed). In the 1st PCR, CD19 transcript was amplified with ‘partial Read 1’ primer (or P12) and CD19 primer P10. Cell-specific CD19 cDNA amplifications were carried out with primers comprising the 10X cell barcode (BC primers) and P14 or P13 for respectively 2nd and 3rd PCR (Table S1). For these nested-PCR, 1µl aliquots of primary or secondary PCR were used. PCR products were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis.

Data and scripts availability

Fastq raw data will be available in GEO. For reproducibility, docker images and detailed scripts used for preprocessing and further analysis will be available respectively at zenodo and github.

Supplementary references

1. Van Buggenum, J. A. G. L. et al. A covalent and cleavable antibody-DNA conjugation strategy for sensitive protein detection via immuno-PCR. *Sci Rep* 6, 22675 (2016).
2. Stuart, T. et al. Comprehensive Integration of Single-Cell Data. *Cell* 177, 1888-1902.e21 (2019).
3. Zheng, G. X. Y. et al. Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells. *Nat Commun* 8, 14049 (2017).
4. Butler, A., Hoffman, P., Smibert, P., Papalexi, E. & Satija, R. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. *Nat. Biotechnol.* 36, 411–420 (2018).
5. Aibar, S. et al. SCENIC: single-cell regulatory network inference and clustering. *Nat. Methods* 14, 1083–1086 (2017).

Supplementary Table

Table S 1. Oligonucleotide sequences.

All oligonucleotides were synthesized by Integrated DNA Technologies (IDT) Company. For HTO, the specific index sequences are highlighted in red and (*) indicates a phosphorothioate bond. For BC primers, 10X cell identifier barcodes are indicated in green.

Sequences of HTO

HTO-A GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT AAGTATCGTTTCGCA CCCATATAAGA*A*A
HTO-B GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT CTTTGTCTTTGTGAG CCCATATAAGA*A*A
HTO-C GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT CTTGCCGCATGTCAT CCCATATAAGA*A*A
HTO-D GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT AAAGCATTCTTCACG CCCATATAAGA*A*A

Primers for PCR/nested PCR

P12 CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATC T
P10 CCTGGGAGAGCTGGTCCTGCC
P14 CCTCCTCACTGTCAGGTTCT
P13 CGTACTGGTTCTGGGGCCCGC
P3 AGAGTCTGACCACCATGCC
P4 TTGGGGACTTGAGGAGATCC
P8 CCCTCCACATTGACTGTCC
P9 GGCCGAGCAGTGATCTCCAGG
P33 GAGGCTCTGGTTCAGGCTGT

BC primers for cell backtracking

BC 2 GATCTCACCCTTCTTGACC
BC 3 GATCTGTGCGGTTGAGGTAG
BC 4 GATCTCTAGTGACAATGGTCT
BC 6 GATCTGACACGCAGTCCGGTC
BC 7 GATCTGTTACAGGTTACAGAA
BC 8 GATCTCCTCAGTGTGATGATA
BC 11 GATCTCCGTGGACAGCTGGCT
BC 12 GATCTGTAAAGCTCTAACCGA
BC 16 GATCTAGATCTGGTGAGGCTA
BC 17 GATCTGAATAAGGTGCACTTA
BC 18 GATCTGGACGTCGTAAACACA
BC 19 GATCTTACACGAAGTACGCCC
BC 20 GATCTATTATCCTCAGATAAG
BC 21 GATCTATCATCTGTGGACGAT
BC 22 GATCTGCATGCGGTCGAAAGC
BC 38 GATCTCGGAGTCGTATGCTTG

Supplementary Figures

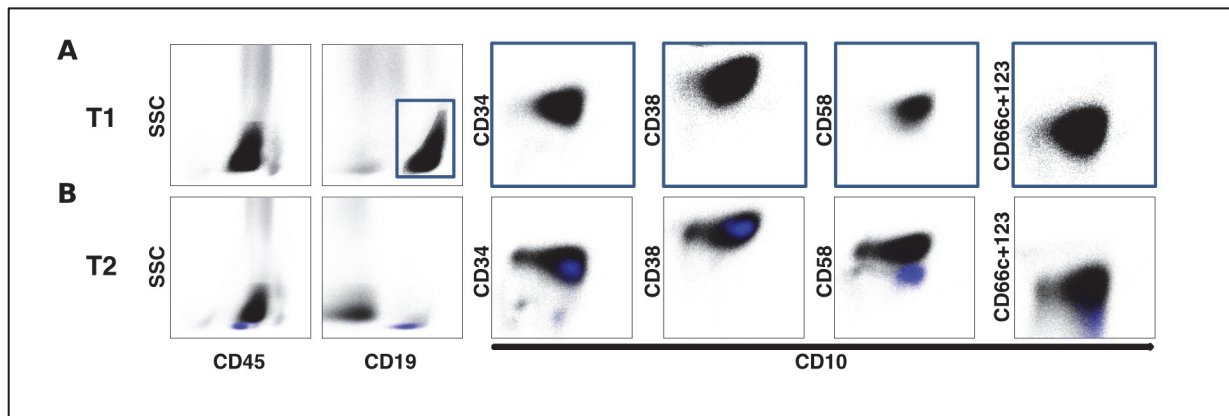


Figure S 1. Flow cytometry immunophenotyping of leukemic blasts.

Cells were stained with CD45-KrO, CD19-PC7, CD34-ECD, CD10-FITC, CD38-APC, CD58-PC5 and CD66c+123-PE. Dot plots show the expression of CD45, CD19, CD10, CD34, CD38, CD58 and CD66c+123 on blasts cells before CAR-T treatment (A) and at relapse, three months after (B). (A) At T1, blasts cells (in black) are CD45^{dim} and CD19^{pos}. Gating on CD19^{pos} cells, blasts are CD10^{pos}, CD34^{pos}, CD38^{pos}, CD58^{pos} and CD66+123^{pos}. These markers are used as measurable residual disease (MRD) markers. (B) At T2, blasts cells are CD45^{dim} but CD19^{neg}. They still express the same markers of MRD allowing us to differentiate them from physiological immature B-cells (in blue, around 4% of live cells).

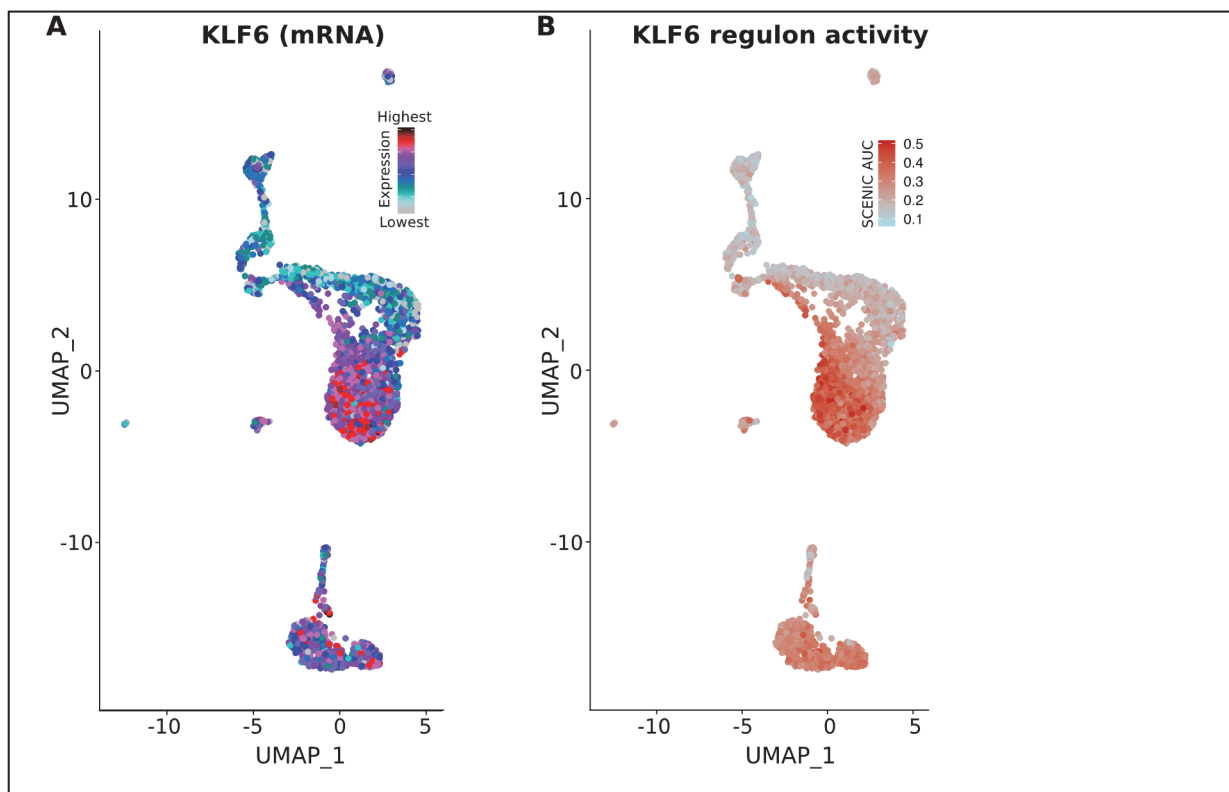


Figure S 2. KLF6 expression in tumoral clusters.

UMAP visualization of KLF6 mRNA expression (A) and regulon activity (B) in the 6 main clusters. In cluster 1, down-regulation of KLF6 comes along a decrease of its activity as assessed by its regulon activity using SCENIC⁵.

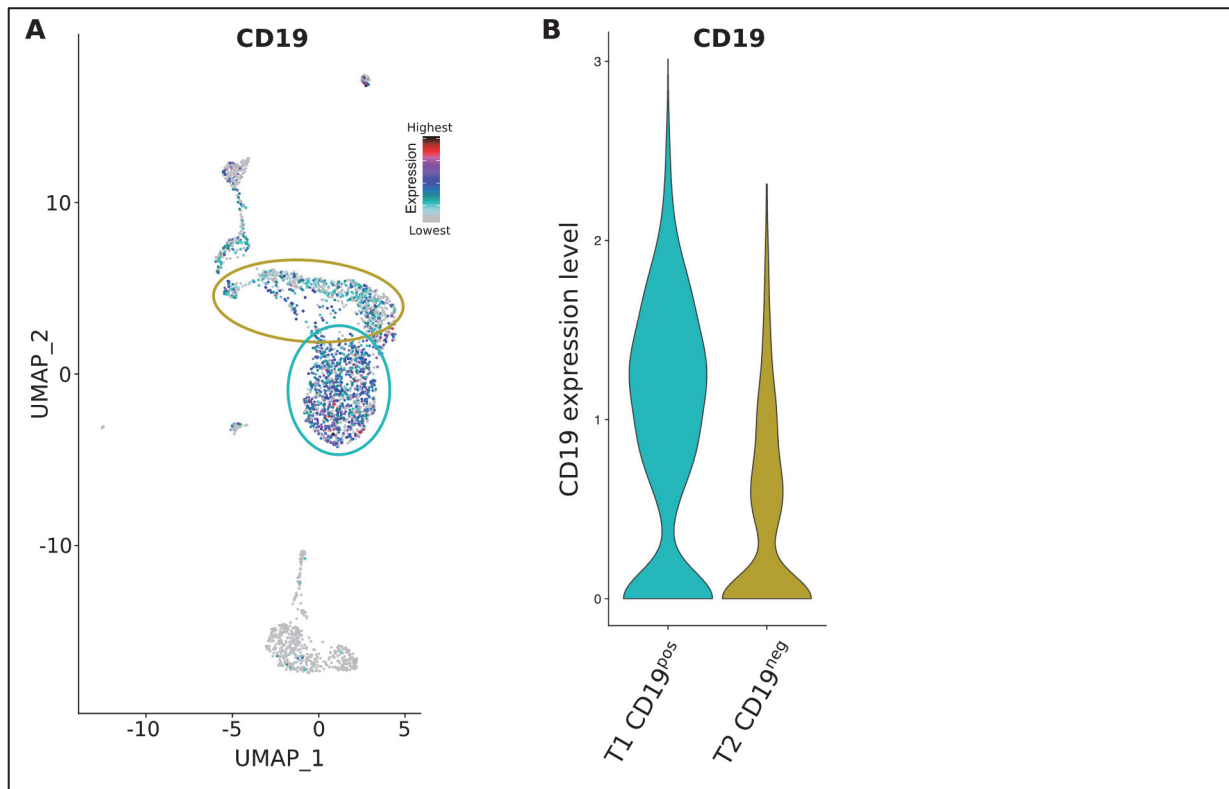


Figure S 3. Analysis of CD19 transcriptional expression.

UMAP visualization (A) and violin plot (B) of CD19 mRNA expression in T1-CD19^{pos} cells (blue) and T2-CD19^{neg} cells (gold). Here mostly the 5' region of CD19 mRNA is captured since we used 5' 10XGenomic approach.

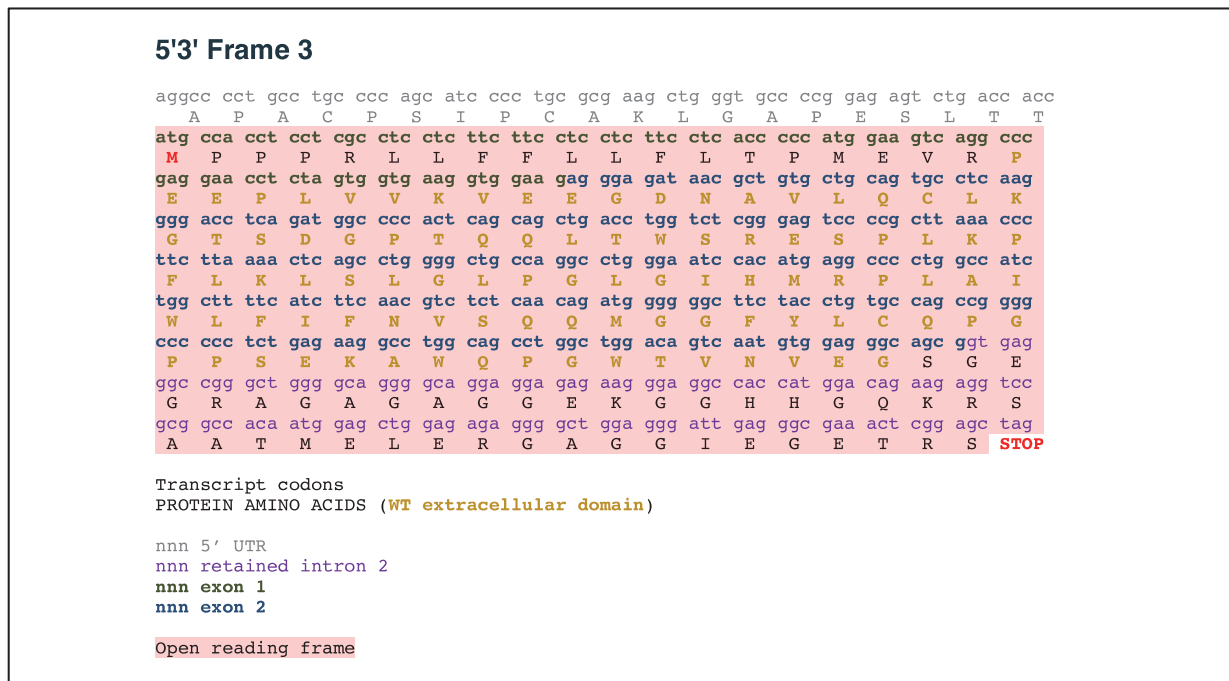


Figure S 4. Non-functional CD19 mRNA isoform is expressed in leukemic cells.

CD19 transcript codons and their corresponding protein amino acids from 5' UTR region to retained intron 2 (purple) which contained a TAG stop codon leading to a truncated CD19 protein.

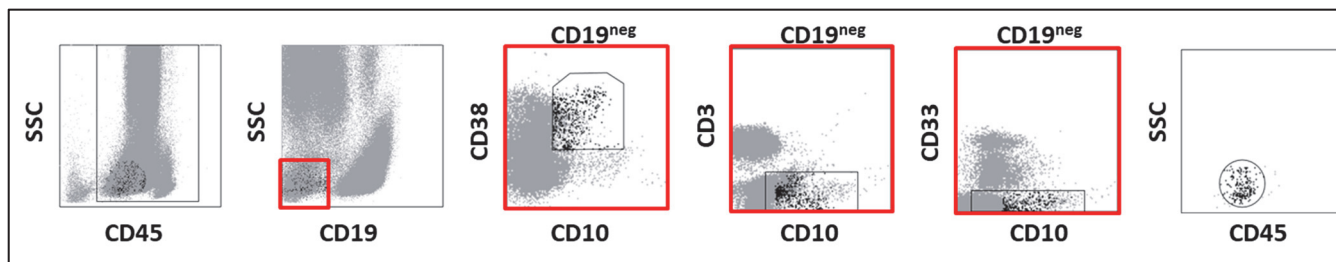


Figure S 5. FACS analysis of CD19neg cells before CAR-T treatment.

T1 cells were first gated on SSC/CD45 to eliminate cellular debris. Then, CD19neg cells were selected and analyzed according to the positivity of MRD markers (CD38pos, CD10neg) and the negativity of lymphoid T-cell (CD3) and myeloid cell (CD33) markers. The boolean gate shows the cells with the appropriate phenotype.

DISCUSSION

L'immunothérapie constitue une révolution dans le traitement du cancer de cette dernière décennie. Parmi les multiples approches capables de renforcer le pouvoir du système immunitaire contre le cancer, les immunothérapies à base de cellules T représentent l'un des exemples les plus aboutis. En particulier, les avancées biotechnologiques ont permis, d'une part, la génération d'anticorps bispécifiques capables de rediriger les lymphocytes T non tumoraux contre des cellules leucémiques exprimant une cible antigénique particulière ; et d'autre part, la reprogrammation de lymphocytes T exprimant un récepteur chimérique (CAR) capable de reconnaître un antigène tumoral et d'induire l'activation de ces lymphocytes T. Plus spécifiquement, dans les leucémies aiguës lymphoblastiques B (LAL-B), le Blinatumomab (Blinicyto[®]), anticorps bispécifique anti-CD19/CD3, et les CAR-T cells anti-CD19 (Tisagenlecleucel, (Kymriah[®])) ont permis l'obtention de réponses thérapeutiques chez les patients atteints de LAL-B récidivantes et/ou réfractaires. Néanmoins, chez les patients ayant un état général et une espérance de vie compatibles avec l'administration d'un traitement par CAR-T cells, l'HAS considère que le Tisagenlecleucel (Kymriah[®]) devrait être privilégié.

Le Blinatumomab (Blinicyto[®]) est le premier anticorps monoclonal bispécifique (BiTE[®] pour Bi-specific T cell engager) qui se lie sélectivement au CD19, exprimé à la surface des cellules de la lignée B, et au CD3, exprimé à la surface des lymphocytes T³. Il crée ainsi une liaison entre les cellules T cytotoxiques CD3-positives du patient et les cellules B CD19-positives, induisant la lyse des cellules B exprimant le CD19, saines et malignes. Cet anticorps bispécifique fait désormais partie de la stratégie thérapeutique ciblée ayant prouvé son efficacité, et représente ainsi une alternative aux traitements de rattrapage par chimiothérapie dans le traitement de la LAL-B CD19-positif avec chromosome Philadelphie négatif, réfractaire ou en rechute après au moins deux traitements antérieurs, ou en rechute après une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques antérieure chez les enfants à partir de l'âge de 1 an⁹⁹.

Les CAR-T cells anti-CD19 ont montré des résultats prometteurs dans de larges études cliniques^{10,12,67}. A ce jour, deux médicaments ont actuellement l'AMM en Europe : le Tisagenlecleucel (Kymriah[®]) dans les LAL-B réfractaires ou en rechute et dans les lymphomes B non Hodgkiniens et l'Axicabtagene ciloleucel (Yescarta[®]) dans les lymphomes B non Hodgkiniens. Leur utilisation reste très encadrée par l'HAS, et en France, seuls certains centres

accrédités y ont accès. Bien que les CAR-T cells représentent une des approches les plus innovantes pour traiter les leucémies aiguës lymphoblastiques B récidivantes ou réfractaires de l'enfant et de l'adulte jeune, le recul sur cette thérapie ciblée reste cependant insuffisant à ce jour, et des premiers écueils apparaissent. Les effets secondaires à court terme à type de syndrome de relargage cytokinique (SRC) ou de neurotoxicité sont fréquents et nécessitent une coordination étroite de la prise en charge avec les unités de réanimation médicale. A moyen terme, la perte de persistance des CAR-T cells qui expose au risque de rechute CD19-positives, et l'échappement tumoral par modulation antigénique et perte du CD19 membranaire conduisant à des rechutes CD19-négatives, représentent des enjeux thérapeutiques.

Notre étude aborde ainsi l'importante question clinique de la résistance aux CAR-T cells et révèle que la préexistence de clones CD19-négatifs pourrait être un mécanisme de rechute dans les LAL-B de l'enfant et de l'adulte jeune. En effet, nos résultats suggèrent que ces clones très minoritaires CD19-négatifs, détectés par single-cell RNA sequencing, préexistent déjà au diagnostic et pourraient évoluer au cours de la thérapie par CAR-T cells en tant que clone dominant, par une sélection de type Darwinienne. Une précédente étude a aussi suggéré la présence de clones de LAL-B CD19-négatifs avant le traitement CAR-T cells⁸⁴. Cependant, dans ce projet mené par Grupp et al., des cellules CD19-négatives (~7%) ont été détectées par FACS après une stratégie de 'gating' basée sur la sélection de cellules vivantes CD45-positives, SSC-faible, et CD34-positives⁸⁴. Ainsi, cette analyse n'exclue pas auparavant certaines cellules non leucémiques telles que les myéloblastes, et une analyse par biologie moléculaire pour valider de manière convaincante leur origine leucémique paraît donc essentielle. De plus, pour le patient de notre étude, nous démontrons également que les cellules leucémiques CD19-négatives expriment une isoforme non fonctionnelle du transcrit CD19 par rétention de l'intron 2, conduisant ainsi à une protéine CD19 tronquée, qui ne sera donc pas ciblée par les CART-19. Cette anomalie moléculaire avait été précédemment décrite dans l'étude de Asnani et al⁸³. Une autre équipe⁸² a mis en évidence la préexistence d'isoformes non fonctionnelles du CD19, partiellement ou totalement délétées de l'exon 2 (Δ exon2), et présentes avant la thérapie par CAR-T cells. Cependant, il n'a pas été démontré que cette isoforme est exprimée uniquement dans les clones leucémiques pouvant alors être responsables de la rechute. En effet, notre étude montre que l'altération du transcrit peut être présente dans les clones CD19-positifs ; ainsi une analyse transcriptomique en 'bulk' ne peut pas démontrer la présence de clones CD19-négatifs. Par conséquent, jusqu'à maintenant, les études à ce sujet ont montré que la négativité du CD19 résulte principalement d'une altération de l'expression de l'ARN messager du CD19, due à une

anomalie dans les exons 2 à 5⁷⁸ sous l'effet du traitement par CART-19. Des switches de lignée dans les LAL avec réarrangement du gène MLL⁸⁵ ont également été décrits, ainsi qu'une lyse fratricide des CAR-T cells par mécanisme de trogocytose⁹¹, mais leurs fréquences restent exceptionnelles. Un cas unique de rechute CD19-négative causée par la transduction accidentelle d'une cellule B leucémique par un CAR a également été rapporté⁹².

Ainsi, l'avancée majeure de notre étude est la preuve que nous pouvons détecter à l'avance, par single-cell RNA sequencing, de rares sous-clones leucémiques CD19-négatifs préexistants, responsables de la résistance au traitement par CAR-T cells. De plus, nos résultats suggèrent que la détection de biomarqueurs tels que la rétention de l'intron 2 dans le transcrit CD19 pourrait s'avérer pertinente, afin d'identifier les patients réfractaires à une thérapie par CAR-T cells. Pour cela, et aux vues des nombreuses altérations de l'ARNm du CD19 mises en évidence dans les précédentes études, il semble donc important de disséquer les déterminants moléculaires intervenant dans l'épissage des exons du CD19 et de les corrélés avec l'effet thérapeutique.

De plus, l'ensemble de ces études soulignent également le risque d'utiliser la thérapie par CAR-T cells anti-CD19 en monothérapie, puisqu'environ la moitié des rechutes de LAL-B post-CART-19 sont liées à la perte d'expression du CD19 à la surface de la cellule leucémique. Ces résultats suggèrent ainsi l'utilité potentielle d'un CAR ciblant une autre cible en cas de rechute, ou d'une approche combinant deux CAR.

La faisabilité et la tolérance de CAR-T cells dirigées contre d'autres cibles antigéniques comme le CD22, exprimé également par les cellules lymphoïdes B saines et malignes, sont actuellement évaluées en préclinique et dans des études cliniques de phase I/II et pourraient constituer une stratégie de traitement prometteuse en contournant cet échappement tumoral^{50,100}. Actuellement, six études prospectives utilisant des CAR-T cells anti-CD22 sont en cours ou sur le point de débiter¹⁰¹, et les résultats préliminaires de ces études montrent que les CAR-T cells anti-CD22 semblent au moins partiellement efficaces et tolérées dans le cadre du traitement des LAL-B CD22-positives¹⁰². L'antigène CD123 semble être également une cible intéressante en cas de rechute CD19-négative, puisqu'il semblerait fortement exprimé par les cellules lymphoblastiques B, et cette expression persisterait en cas de rechute CD19-négative après traitement par CAR-T cells. De plus, les CAR-T cells anti-CD123 semblent avoir une efficacité anti-tumorale *in vitro* et dans un modèle de xénogreffe avec des cellules issues d'un patient ayant présenté une rechute CD19-négative¹⁰³. Cependant, même si les antigènes

CD22 et CD123 sont exprimés dans les LAL-B, y compris dans les rechutes CD19-négatives, on peut supposer que le ciblage d'un marqueur unique pourrait inévitablement entraîner une perte d'antigène, comme c'est le cas pour le CD19. C'est pourquoi le ciblage de plus d'un antigène sur les cellules leucémiques représente une stratégie raisonnable pour éviter l'échappement tumoral dû à la perte d'antigène.

Deux stratégies de combinaisons de CAR sont actuellement développées. En effet, soit le lymphocyte T exprime 2 CAR différents (dual-CAR), soit le lymphocyte T exprime un CAR contenant 2 domaines de liaison différents « en tandem » (TanCAR). Outre le risque d'échappement thérapeutique, cibler un antigène unique peut être également insuffisant pour discriminer de façon certaine la cellule tumorale des cellules saines. Ainsi, pour augmenter la spécificité, il est possible de créer un lymphocyte T transduit par un seul vecteur viral qui code pour deux molécules CAR indépendantes. Les 2 CAR reconnaissent alors deux cibles spécifiques de la cellule tumorale : c'est le dual-CAR¹⁰⁴. Cette stratégie permet aussi de limiter la toxicité sur les cellules saines, et, par rapport aux CAR à cible unique, les dual-CAR conduiraient à une production accrue d'IFN- γ et d'IL-2 in vitro et in vivo dans les premières études précliniques¹⁰⁵. Les TanCAR, quant à elles, combinent une seule structure CAR ciblant deux antigènes tumoraux avec deux domaines de reconnaissance antigéniques distincts (scFv), liés consécutivement à un seul domaine intracellulaire¹⁰⁶. L'utilisation de TanCAR CD19+CD22+ ou CD19+CD123+ permettrait également une meilleure sélectivité des cellules tumorales, et limiterait la pression de sélection induite par les CAR-T cells anti-CD19. Ainsi, ces combinaisons de CAR ont montré une activité tumorale supérieure aux CAR ciblant un antigène unique in vivo en préclinique^{103,107}. Actuellement, 12 études cliniques utilisant des CAR-T cells bispécifiques anti-CD19 et anti-CD22 sont en cours¹⁰¹.

Un impact important de notre étude est que le risque d'échec du traitement ciblé par les cellules CAR-T pourrait être évalué au préalable par la détection, par single-cell RNA sequencing, de clones minoritaires CD19-négatifs préexistants. La stratégie thérapeutique prospective pourrait ainsi être adaptée en conséquence. La suite de ce projet consistera donc à confirmer les résultats obtenus chez d'autres patients atteints de LAL-B en rechute CD19-négative après traitement par CAR-T cells ; et de poursuivre les analyses single-cell sur des patients en rémission et en rechute CD19-positive après administration de CART-19, dans le but, cette fois-ci, de prouver l'absence de clones CD19-négatifs préexistants. Si ces observations venaient à être confirmées, outre l'impact potentiel de notre étude sur la prise en charge thérapeutique des patients, notre stratégie de détection pourrait se révéler également

intéressante d'un point de vue économique. En effet, cette approche thérapeutique suscite de grands espoirs pour la prise en charge des patients atteints d'hémopathies malignes et de tumeurs solides en impasse thérapeutique, mais l'ingénierie est complexe et oblige à définir plus précisément des critères standardisés pour sa mise en œuvre, et à limiter leur utilisation dans certains centres bien spécifiés. De plus, de nombreuses réserves concernant leur efficacité ont été émises par la Commission d'Evaluation Economique et de Santé Publique (CEESP), compte tenu du coût très élevé (environ 350 000 euros par poche), et des incertitudes d'un tel investissement pour obtenir un bénéfice clinique¹⁰⁸. Le coût extrême de ces thérapies soulève également la question de la capacité des systèmes de santé à maîtriser un accès équitable aux patients, d'autant plus que l'administration de ces produits a un impact organisationnel considérable : les éventuels déplacements et/ou hébergements du patient à proximité de l'établissement de santé qualifié pendant plusieurs semaines sont à prendre en compte, et devrait faire l'objet d'une prise en charge adaptée, au risque d'augmenter les inégalités sociales et territoriales de santé. Ainsi, le prix annoncé du médicament mais également généré par cette prise en charge complexe, de l'aphérèse au suivi post-injection, constitue assurément un réel enjeu de santé publique. Il apparaît donc nécessaire de définir des critères permettant une meilleure éligibilité des patients, en identifiant par exemple, des facteurs prédictifs de bonne réponse à la thérapie. Notre étude s'inscrit donc dans cette démarche, et s'ils venaient à être confirmés, nos résultats permettraient ainsi une meilleure maîtrise des dépenses de santé publique et une optimisation de la prise en charge thérapeutique des patients.

CONCLUSION

Les CAR-T cells ciblant l'antigène CD19 sont des médicaments d'un genre nouveau, où de nombreux paramètres influencent à la fois l'efficacité, la tolérance, l'accessibilité ou le prix du médicament. Cette nouvelle thérapie s'avère être une approche efficace pour traiter les patients atteints de LAL-B réfractaires à la thérapie conventionnelle. Cependant, environ 35% des patients rechutent et plus de la moitié de ces rechutes sont CD19-négatives. Des études antérieures ont examiné le mécanisme d'inhibition de l'expression du CD19, mais à ce jour, aucune étude n'a formellement démontré si des clones leucémiques CD19-négatifs étaient présents avant la thérapie cellulaire par CAR-T cells.

Nous avons ainsi abordé cette question et démontré que de rares clones de LAL-B CD19-négatifs étaient présents avant CAR-T cells, ce qui implique que la rechute résulterait d'une sélection Darwinienne de rares sous-clones préexistants, et non du traitement par les cellules CAR-T en soi. Ainsi, l'avancée majeure de notre étude est que nous pouvons détecter à l'avance des sous-clones leucémiques minoritaires responsables de la rechute. Une implication importante de cette découverte est que le risque d'échec du traitement ciblé par CAR-T cells anti-CD19 pourrait être évalué, et donc que la stratégie thérapeutique pourrait être adaptée en conséquence. Ces données nécessitent, bien entendu, d'être confirmées sur un nombre suffisant de patients pour être généralisées.

De plus, d'autres interrogations concernant l'évaluation des CAR-T cells dans les LAL-B de l'enfant et de l'adulte jeune à des phases plus précoces de la maladie, le rôle de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques avant ou après l'administration des CAR-T cells, la prédictibilité et la gestion des effets secondaires de type SRC, ou le développement de stratégies permettant de limiter les échappements par perte d'expression de la cible, nécessitent un suivi à plus long terme des patients traités. L'ensemble de ces problématiques imposent ainsi une réflexion à toutes les étapes de développement des CAR-T cells.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Immunothérapie : mode d'action - Thérapies ciblées et immunothérapie spécifique | Institut National Du Cancer [Internet]. Disponible sur: <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Se-faire-soigner/Traitements/Therapies-ciblees-et-immunotherapie-specifique/Immunotherapie-mode-d-action>.
2. Hoos A. Development of immuno-oncology drugs - from CTLA4 to PD1 to the next generations. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2016;15(4):235–247.
3. May MB, Glode A. Blinatumomab: A novel, bispecific, T-cell engaging antibody. *Am. J. Health-Syst. Pharm. AJHP Off. J. Am. Soc. Health-Syst. Pharm.* 2016;73(1):e6–e13.
4. Rosenberg SA, Spiess P, Lafreniere R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science.* 1986;233(4770):1318–1321.
5. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, et al. Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes. *Science.* 2006;314(5796):126–129.
6. Johnson LA, Morgan RA, Dudley ME, et al. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood.* 2009;114(3):535–546.
7. Morgan RA, Chinnsamy N, Abate-Daga D, et al. Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy. *J. Immunother. Hagerstown Md* 1997. 2013;36(2):133–151.
8. Aleksic M, Liddy N, Molloy PE, et al. Different affinity windows for virus and cancer-specific T-cell receptors: implications for therapeutic strategies. *Eur. J. Immunol.* 2012;42(12):3174–3179.
9. Porter DL, Hwang W-T, Frey NV, et al. Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Sci. Transl. Med.* 2015;7(303):303ra139-303ra139.
10. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2018;378(5):439–448.
11. Gardner RA, Finney O, Annesley C, et al. Intent-to-treat leukemia remission by CD19 CAR T cells of defined formulation and dose in children and young adults. *Blood.* 2017;129(25):3322–3331.
12. Maude SL, Pulsipher MA, Boyer MW, et al. Efficacy and Safety of CTL019 in the First US Phase II Multicenter Trial in Pediatric Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia: Results of an Interim Analysis. *Blood.* 2016;128(22):2801–2801.
13. Galaine J, Godet Y, Adotévi O. Pour comprendre : l'activation lymphocytaire T. *Bull. Cancer (Paris).* 2016;103:S127–S131.
14. Dai H, Wang Y, Lu X, Han W. Chimeric Antigen Receptors Modified T-Cells for Cancer Therapy. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 2016;108(7):.
15. Makita S, Yoshimura K, Tobinai K. Clinical development of anti-CD19 chimeric antigen receptor T-cell therapy for B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Sci.* 2017;108(6):1109–1118.
16. Zhang C, Liu J, Zhong JF, Zhang X. Engineering CAR-T cells. *Biomark. Res.* 2017;5(1):22.
17. Jackson HJ, Rafiq S, Brentjens RJ. Driving CAR T-cells forward. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2016;13(6):370–383.
18. Zhao J, Lin Q, Song Y, Liu D. Universal CARs, universal T cells, and universal CAR T cells. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol.* 2018;11(1):132.

19. Dourthe M-É, Yakouben K, Chaillou D, et al. CAR-T cells : indications actuelles en pédiatrie et perspectives de développement. *Bull. Cancer (Paris)*. 2018;105:S147–S157.
20. Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1989;86(24):10024–10028.
21. 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;90(2):720–724.
22. Wang Z, Guo Y, Han W. Current status and perspectives of chimeric antigen receptor modified T cells for cancer treatment. *Protein Cell*. 2017;8(12):896–925.
23. Rubio M-T, Galaine J, Borg C, Daguindau É. Biologie, concepts et principes des CAR-T cells. *Bull. Cancer (Paris)*. 2018;105:S135–S146.
24. Brocker T, Karjalainen K. Signals through T cell receptor-zeta chain alone are insufficient to prime resting T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1995;181(5):1653–1659.
25. 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(5):1999–2001.
26. van der Stegen SJC, Hamieh M, Sadelain M. The pharmacology of second-generation chimeric antigen receptors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2015;14(7):499–509.
27. Maher J, Brentjens RJ, Gunset G, Rivière I, Sadelain M. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCR ζ /CD28 receptor. *Nat. Biotechnol.* 2002;20(1):70–75.
28. Imai C, Mihara K, Andreansky M, et al. Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2004;18(4):676–684.
29. Zhao Z, Condomines M, van der Stegen SJC, et al. Structural Design of Engineered Costimulation Determines Tumor Rejection Kinetics and Persistence of CAR T Cells. *Cancer Cell*. 2015;28(4):415–428.
30. 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(12):2935–2944.
31. EMA. Kymriah, RCP. Disponible sur: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/kymriah-epar-product-information_fr.pdf.
32. EMA. Yescarta, RCP. Disponible sur: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/yescarta-epar-product-information_fr.pdf.
33. Chmielewski M, Abken H. TRUCKS: the fourth generation of CARs. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2015;15(8):1145–1154.
34. 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(17):5697–5706.
35. INCa. Immunothérapies spécifiques dans le traitement des cancers : rapport et une synthèse.
36. Levine BL. Performance-enhancing drugs: design and production of redirected chimeric antigen receptor (CAR) T cells. *Cancer Gene Ther.* 2015;22(2):79–84.
37. Sadelain M, Rivière I, Riddell S. Therapeutic T cell engineering. *Nature*. 2017;545(7655):423–431.
38. Sommermeyer D, Hudecek M, Kosasih PL, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8⁺ and CD4⁺ subsets confer superior antitumor reactivity in vivo. *Leukemia*. 2016;30(2):492–500.

39. Hu WS, Pathak VK. Design of retroviral vectors and helper cells for gene therapy. *Pharmacol. Rev.* 2000;52(4):493–511.
40. Milone MC, O’Doherty U. Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia.* 2018;32(7):1529–1541.
41. Jin C, Fotaki G, Ramachandran M, et al. Safe engineering of CAR T cells for adoptive cell therapy of cancer using long-term episomal gene transfer. *EMBO Mol. Med.* 2016;8(7):702–711.
42. Bishop DC, Xu N, Tse B, 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(8):1883–1895.
43. Singh H, Manuri PR, Olivares S, et al. Redirecting Specificity of T-Cell Populations For CD19 Using the Sleeping Beauty System. *Cancer Res.* 2008;68(8):2961–2971.
44. Smith TT, Stephan SB, Moffett HF, et al. In situ programming of leukaemia-specific T cells using synthetic DNA nanocarriers. *Nat. Nanotechnol.* 2017;12(8):813–820.
45. Somerville RPT, Dudley ME. Bioreactors get personal. *OncoImmunology.* 2012;1(8):1435–1437.
46. Yakoub-Agha I, Chabannon C, Bader P, et al. Management of adults and children undergoing chimeric antigen receptor 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.* 2020;105(2):297–316.
47. Yang Y, Jacoby E, Fry TJ. Challenges and opportunities of allogeneic donor-derived CAR T cells. *Curr. Opin. Hematol.* 2015;22(6):509–515.
48. Qasim W, Zhan H, Samarasinghe S, et al. Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. *Sci. Transl. Med.* 2017;9(374):eaaj2013.
49. Vairy S, Garcia JL, Teira P, Bittencourt H. CTL019 (tisagenlecleucel): CAR-T therapy for relapsed and refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Drug Des. Devel. Ther.* 2018;12:3885–3898.
50. Fry TJ, Shah NN, Orentas RJ, et al. CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy. *Nat. Med.* 2018;24(1):20–28.
51. Edwards JCW, Cambridge G. B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 2006;6(5):394–403.
52. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, et al. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood.* 2011;117(19):5019–5032.
53. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J.* 2017;7(6):e577–e577.
54. Brown P, Inaba H, Annesley C, et al. Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia, Version 2.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J. Natl. Compr. Cancer Netw. JNCCN.* 2020;18(1):81–112.
55. Orphanet: Leucémie lymphoblastique aiguë.
56. Société française d’Hématologie. Hématologie, Chapitre 4: Item 312 – UE 9 Leucémies aiguës. 3ème édition. Elsevier Masson; 2018.
57. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia.* 1995;9(10):1783–1786.

58. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391–2405.
59. Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *N. Engl. J. Med.* 2015;373(16):1541–1552.
60. Cooper SL, Brown PA. Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatr. Clin. North Am.* 2015;62(1):61–73.
61. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Acute lymphoblastic Leukemia. March 2018.
62. Gaynon PS. Childhood acute lymphoblastic leukaemia and relapse. *Br. J. Haematol.* 2005;131(5):579–587.
63. HAS. Avis CT Kymriah (LAL) [Internet]. Disponible sur: https://has-sante.fr/jcms/c_2891689/fr/kymriah-tisagenlecleucel-car-t-anti-cd19-lal.
64. Kansagra AJ, Frey NV, Bar M, et al. Clinical Utilization of Chimeric Antigen Receptor T Cells in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: An Expert Opinion from the European Society for Blood and Marrow Transplantation and the American Society for Transplantation and Cellular Therapy. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2019;25(3):e76–e85.
65. Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *The Lancet.* 2015;385(9967):517–528.
66. Lee DW, Stetler-Stevenson M, Yuan CM, et al. Long-Term Outcomes Following CD19 CAR T Cell Therapy for B-ALL Are Superior in Patients Receiving a Fludarabine/Cyclophosphamide Preparative Regimen and Post-CAR Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Blood.* 2016;128(22):218–218.
67. Grupp SA, Maude SL, Rives S, et al. Updated Analysis of the Efficacy and Safety of Tisagenlecleucel in Pediatric and Young Adult Patients with Relapsed/Refractory (r/r) Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood.* 2018;132(Supplement 1):895–895.
68. Curran KJ, Margossian SP, Kernan NA, et al. Toxicity and response after CD19-specific CAR T-cell therapy in pediatric/young adult relapsed/refractory B-ALL. *Blood.* 2019;134(26):2361–2368.
69. Study of Efficacy and Safety of Tisagenlecleucel in HR B-ALL EOC MRD Positive Patients - Full Text View - ClinicalTrials.gov.
70. Novartis Pharmaceuticals. Tisagenlecleucel Versus Blinatumomab or Inotuzumab for Adult Patients With Relapsed/Refractory B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia: A Randomized Open Label, Multicenter, Phase III Trial. clinicaltrials.gov; 2020.
71. Brudno JN, Kochenderfer JN. Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: recognition and management. *Blood.* 2016;127(26):3321–3330.
72. Maude SL, Frey N, Shaw PA, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2014;371(16):1507–1517.
73. Singh N, Lee YG, Shestova O, et al. Impaired Death Receptor Signaling in Leukemia Causes Antigen-Independent Resistance by Inducing CAR T-cell Dysfunction. *Cancer Discov.* 2020;10(4):552–567.
74. Xu X, Sun Q, Liang X, et al. Mechanisms of Relapse After CD19 CAR T-Cell Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia and Its Prevention and Treatment Strategies. *Front. Immunol.* 2019;10:2664.
75. Cao J, Cheng H, Shi M, et al. Humanized CD19-specific chimeric antigen-receptor T-cells in 2 adults with newly diagnosed B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2019;33(11):2751–2753.

76. Maude SL, Barrett DM, Rheingold SR, et al. Efficacy of Humanized CD19-Targeted Chimeric Antigen Receptor (CAR)-Modified T Cells in Children and Young Adults with Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*. 2016;128(22):217–217.
77. Gardner R, Finney O, Brakke H, et al. Starting T Cell and Cell Product Phenotype Are Associated with Durable Remission of Leukemia Following CD19 CAR-T Cell Immunotherapy. *Blood*. 2018;132(Supplement 1):4022–4022.
78. Orlando EJ, Han X, Tribouley C, et al. Genetic mechanisms of target antigen loss in CAR19 therapy of acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Med.* 2018;24(10):1504–1506.
79. Sotillo E, Barrett DM, Black KL, et al. Convergence of Acquired Mutations and Alternative Splicing of CD19 Enables Resistance to CART-19 Immunotherapy. *Cancer Discov.* 2015;5(12):1282–1295.
80. Barrett DM, Seif AE, Carpenito C, et al. Noninvasive bioluminescent imaging of primary patient acute lymphoblastic leukemia: a strategy for preclinical modeling. *Blood*. 2011;118(15):e112-117.
81. Wang B-D, Lee N. Aberrant RNA Splicing in Cancer and Drug Resistance. *Cancers*. 2018;10(11):458.
82. Fischer J, Paret C, El Malki K, et al. CD19 Isoforms Enabling Resistance to CART-19 Immunotherapy Are Expressed in B-ALL Patients at Initial Diagnosis: *J. Immunother.* 2017;40(5):187–195.
83. Asnani M, Hayer KE, Naqvi AS, et al. Retention of CD19 intron 2 contributes to CART-19 resistance in leukemias with subclonal frameshift mutations in CD19. *Leukemia*. 2019;
84. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, et al. Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells for Acute Lymphoid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2013;368(16):1509–1518.
85. Gardner R, Wu D, Cherian S, et al. Acquisition of a CD19-negative myeloid phenotype allows immune escape of MLL-rearranged B-ALL from CD19 CAR-T-cell therapy. *Blood*. 2016;127(20):2406–2410.
86. Lee DW, Gardner R, Porter DL, et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood*. 2014;124(2):188–195.
87. Cohen A, Petsche D, Grunberger T, Freedman MH. Interleukin 6 induces myeloid differentiation of a human biphenotypic leukemic cell line. *Leuk. Res.* 1992;16(8):751–760.
88. Reynaud D, Pietras E, Barry-Holson K, et al. IL-6 Controls Leukemic Multipotent Progenitor Cell Fate and Contributes to Chronic Myelogenous Leukemia Development. *Cancer Cell*. 2011;20(5):661–673.
89. Perna F, Sadelain M. Myeloid leukemia switch as immune escape from CD19 chimeric antigen receptor (CAR) therapy. *Transl. Cancer Res.* 2016;5(S2):S221–S225.
90. Lucero OM, Parker K, Funk T, et al. Phenotype switch in acute lymphoblastic leukaemia associated with 3 years of persistent CAR T cell directed-CD19 selective pressure. *Br. J. Haematol.* 2019;186(2):333–336.
91. Hamieh M, Dobrin A, Cabriolu A, et al. CAR T cell trogocytosis and cooperative killing regulate tumour antigen escape. *Nature*. 2019;568(7750):112–116.
92. Ruella M, Xu J, Barrett DM, et al. Induction of resistance to chimeric antigen receptor T cell therapy by transduction of a single leukemic B cell. *Nat. Med.* 2018;24(10):1499–1503.
93. Stoeckius M, Hafemeister C, Stephenson W, et al. Simultaneous epitope and transcriptome measurement in single cells. *Nat. Methods*. 2017;14(9):865–868.
94. Butler A, Hoffman P, Smibert P, Papalexi E, Satija R. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. *Nat. Biotechnol.* 2018;36(5):411–420.
95. Index -Single Cell Gene Expression -Official 10x Genomics Support.

96. Buggenum JAG van, Gerlach JP, Tanis SEJ, et al. Immuno-Detection by sequencing (ID-seq) enables large-scale high-dimensional phenotyping in cells. *bioRxiv*. 2017;158139.
97. CITE-seq Hyper Antibody-Oligo Conjugation. https://citeseq.files.wordpress.com/2019/03/cite-seq_hyper_conjugation_190321.pdf.
98. Index -Single Cell Immune Profiling -Official 10x Genomics Support.
99. HAS. Avis CT Blincyto. https://www.has-sante.fr/upload/docs/evamed/CT-16074_BLINCYTO_PIC_REEV_Avis3_CT16074.pdf.
100. Pan J, Niu Q, Deng B, et al. CD22 CAR T-cell therapy in refractory or relapsed B acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2019;33(12):2854–2866.
101. Grain A, Dourthe M-E, Baruchel A. CAR-T cells et leucémies aiguës lymphoblastiques : avancées et questionnements. *Bull. Cancer (Paris)*. 2020;107(2):234–243.
102. Schultz L, Davis K, Baggott C, Chaudry C, Marcy A, Mavroukakis S, et al. Phase 1 study of CD19/CD22 bispecific chimeric antigen receptor (CAR) therapy in children and young adults with B cell acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood* 2018;132:898.
103. Ruella M, Barrett DM, Kenderian SS, et al. Dual CD19 and CD123 targeting prevents antigen-loss relapses after CD19-directed immunotherapies. *J. Clin. Invest.* 2016;126(10):3814–3826.
104. Roybal KT, Rupp LJ, Morsut L, et al. Precision Tumor Recognition by T Cells With Combinatorial Antigen-Sensing Circuits. *Cell*. 2016;164(4):770–779.
105. Qin H, Ramakrishna S, Nguyen S, et al. Preclinical Development of Bivalent Chimeric Antigen Receptors Targeting Both CD19 and CD22. *Mol. Ther. Oncolytics*. 2018;11:127–137.
106. Grada Z, Hegde M, Byrd T, et al. TanCAR: A Novel Bispecific Chimeric Antigen Receptor for Cancer Immunotherapy. *Mol. Ther. - Nucleic Acids*. 2013;2:e105.
107. Biondi A, Magnani CF, Tettamanti S, Gaipa G, Biagi E. Redirecting T cells with Chimeric Antigen Receptor (CAR) for the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J. Autoimmun.* 2017;85:141–152.
108. CAR-T cells : des médicaments prometteurs, que la HAS réévaluera pour en confirmer le potentiel. Haute Autorité de santé. Disponible sur : https://www.has-sante.fr/jcms/c_2970845/fr/car-t-cells-des-medicaments-prometteurs-que-la-has-reevaluera-pour-en-confirmer-le-potentiel].

SERMENT DE GALIEN

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

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

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

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

RÉSUMÉ

Les CAR-T cells, médicaments de thérapie innovante issus de la reprogrammation génique des lymphocytes T, apparaissent comme une nouvelle étape dans le traitement des cancers, et plus particulièrement dans les hémopathies malignes telles que les leucémies aiguës lymphoblastiques B (LAL-B) et les lymphomes non Hodgkiniens. Des résultats prometteurs sont observés dans de larges études cliniques, à des phases avancées de la maladie où de nombreux patients étaient considérés comme relevant d'une prise en charge palliative. Cependant des premiers écueils apparaissent et environ 35% des patients atteints de LAL-B récidivantes et/ou réfractaires rechutent. Il existe deux mécanismes de rechute après thérapie par CAR-T cells dans les LAL-B : les rechutes CD19-positives, dont le mécanisme clé réside dans la faible persistance des cellules CAR-T, et les rechutes CD19-négatives, ces dernières représentant la majorité des rechutes décrites. Des études récentes ont montré que la négativité du CD19 résulte principalement d'une altération de l'expression de l'ARN messager du CD19, sous l'effet du traitement par CAR-T cells. D'autres mécanismes de rechutes tels que des switchs de lignée dans les LAL avec réarrangement du gène MLL et une lyse fratricide des CAR-T cells par mécanisme de trogocytose, ont également été décrits dans la littérature, mais leurs fréquences restent minoritaires.

Notre étude prouve, pour la première fois, que ces rechutes CD19-négatives peuvent résulter d'une sélection de type Darwinienne de rares sous-clones CD19-négatifs préexistants avant la thérapie par CAR-T cells, et pouvant être détectés par single-cell RNA sequencing. Nos résultats, portant sur un patient unique, sont bien entendu à confirmer pour que la stratégie thérapeutique prospective puisse être ainsi adaptée en conséquence et que la prise en charge thérapeutique des patients soit optimisée.

Mots clés : CAR-T cells, leucémie aiguë lymphoblastique B, single-cell, CITE-seq