



HAL
open science

Suivi des CAR-T cells par cytométrie en flux : expérience du CHU de Marseille et revue de la littérature

Sara Allelova

► To cite this version:

Sara Allelova. Suivi des CAR-T cells par cytométrie en flux : expérience du CHU de Marseille et revue de la littérature. Sciences pharmaceutiques. 2022. dumas-03722202

HAL Id: dumas-03722202

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03722202v1>

Submitted on 13 Jul 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



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

THÈSE D'EXERCICE / DOCTEUR JUNIOR

Phase d'Approfondissement du DES de Biologie Médicale

Soutenu le 30 juin 2022

Par Mme Sara ALLELOVA

Née le 7 avril 1993

À Prague

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 12 avril 2017 portant organisation du troisième cycle des études de Médecine et de Pharmacie

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

TITRE :

**SUIVI DES CAR-T CELLS PAR CYTOMETRIE EN FLUX :
EXPERIENCE DU CHU DE MARSEILLE ET REVUE DE LA LITTERATURE**

----oOo----

JURY :

Président : Mme le Professeur Laurence CAMOIN

Membres : Mme le Docteur Marie LOOSVELD

Mme le Docteur Vanessa NIVAGGIONI

Mme le Docteur Charlotte GROSDIDIER

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, Mme Alexandrine BERTAUD, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, M. Philippe GARRIGUE, M. Guillaume HACHE, M. Thierry TERME
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Patrice VANELLE, M. Pierre TIMON-DAVID,
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Philippe CHARPIOT, M. Riad ELIAS
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Chloé SIMON
<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
M. François DEVRED

GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE

M. Christophe DUBOIS

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

Mme Odile RIMET-GASPARINI
Mme Pascale BARBIER
Mme Manon CARRE
M. Gilles BREUZARD
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pierre REBOUILLON
M. Emmanuel CAUTURE
Mme Véronique ANDRIEU
Mme Marie-Pierre SAVELLI

BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE ET BIOTHERAPIES
PHARMACO ECONOMIE, E-SANTE

M. Jérémy MAGALON
Mme Carole SIANI
Mme Muriel MASI

ENSEIGNANT CDI

ANGLAIS

Mme Angélique GOODWIN

A.H.U.

PHARMACOTECHNIE

Mme Mélanie VELIER

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Françoise DIGNAT-GEORGE

PROFESSEURS

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Mme Laurence CAMOIN-JAU
Mme Florence SABATIER-MALATERRE
Mme Nathalie BARDIN
M. Romaric LACROIX

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET
ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

M. Edouard LAMY
Mme Alexandrine BERTAUD
Mme Claire CERINI
Mme Edwige TELLIER
M. Stéphane POITEVIN
Mme Sandra GHAYAD

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Aurélie LEROYER
Mme Sylvie COINTE

MICROBIOLOGIE

Mme Anne DAVIN-REGLI
Mme Véronique ROUX
M. Fadi BITTAR
Mme Isabelle PAGNIER
Mme Sophie EDOUARD
M. Seydina Mouhamadou DIENE

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE

Mme Carole DI GIORGIO
M. Aurélien DUMETRE
Mme Magali CASANOVA
Mme Anita COHEN

BIOLOGIE CELLULAIRE
BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

Mme Anne-Catherine LOUHMEAU
Mme Alexandra WALTON

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Amandine BONIFAY

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

PRATIQUE OFFICINALE

Mme Emmanuelle TONNEAU-PFUG

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Catherine BADENS

CHIMIE PHYSIQUE - PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. David BERGE-LEFRANC

CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE

M. Pascal RATHELOT
M. Maxime CROZET

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE

M. Patrice VANELLE
M. Thierry TERME

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE, BIOLOGIE CELLULAIRE

Mme Anne FAVEL
M. Quentin ALBERT

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Catherine DEFOORT
M. Alain NICOLAY
Mme Estelle WOLFF
Mme Elise LOMBARD
Mme Camille DESGROUAS
M. Charles DESMARCHELIER
M. Mathieu CERINO

CHIMIE PHYSIQUE - PREVENTION DES RISQUES ET
NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. Duje BURIC
M. Pascal PRINDERRE

CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE MINERALE ET
STRUCTURALE

Mme Sandrine ALIBERT
Mme Caroline DUCROS
M. Marc MONTANA
Mme Manon ROCHE
Mme Fanny MATHIAS

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE
HYDROLOGIE

M. Armand GELLIS
M. Christophe CURTI
Mme Julie BROGGI
M. Nicolas PRIMAS
M. Cédric SPITZ
M. Sébastien REDON

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE

Mme Valérie MAHIOU-LEDDER
Mme Sok Siya BUN
Mme Béatrice BAGHDIKIAN
M. Elnur GARAYEV

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

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION
CHIMIE PHYSIQUE - PREVENTION DES RISQUES ET
NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. Cyril PUJOL

DROIT ET ETHIQUE

Mme Laurie PAHUS

GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE
ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET
COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET
GESTION DE LA PHARMAFAC

Mme Félicia FERRERA

DISPOSITIFS MEDICAUX

Mme Valerie MINETTI-GUIDONI

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

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

MAITRES DE CONFERENCES

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

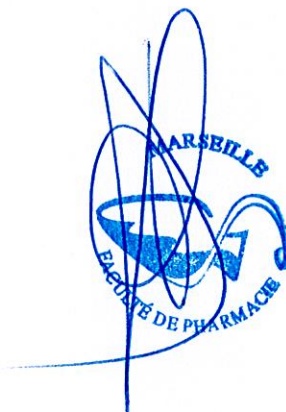
A.H.U.

PHYSIOLOGIE / PHARMACOLOGIE	Mme Anaïs MOYON M. Vincent NAIL
-----------------------------	------------------------------------

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
M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier
M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 13 décembre 2021



**LE DOYEN
F. DIGNAT-GEORGE**

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury,

Mme le Professeur Laurence CAMOIN,

Merci de me faire l'honneur de présider ce jury. Votre bienveillance, vos compétences ainsi que votre passion pour l'enseignement et la transmission du savoir suscite mon admiration et mon profond respect.

Mme le Docteur Marie LOOSVELD,

Merci d'avoir accepté d'encadrer ce travail de thèse. Vous m'avez soutenue et guidée tout au long de ce travail. Veuillez recevoir toute ma gratitude et l'expression de ma considération pour votre engagement, vos conseils et votre grande disponibilité, durant ces mois. J'espère que j'aurai la chance de découvrir le monde de la recherche au sein de votre équipe à Luminy.

Mme le Docteur Vanessa NIVAGGIONI,

Merci d'avoir accepté de faire partie des membres de ce jury. Je vous remercie également pour votre participation à ce projet et pour le temps que vous m'avez accordé pour répondre à toutes mes interrogations.

Mme le Docteur Charlotte GROSDIDIER,

Merci d'avoir accepté de participer à ce jury. C'est à tes cotés que j'ai commencé mon premier stage d'internat et c'est grâce à toi que j'ai découvert « ma passion » pour l'hématologie. Merci pour ta bonne humeur au quotidien, pour ton implication et ta disponibilité dans la formation des internes dont j'ai pu bénéficier, je te prie de recevoir ma plus vive reconnaissance.

Aux différents laboratoires d'APHM,

A tous les biologistes, un grand Merci pour votre implication au quotidien dans la formation des internes et pour la transmission de vos connaissances.

A toute l'équipe du PTTR Nord avec qui j'ai commencé mon premier stage d'internat. Merci, pour tous les petits déjeuners, les gouters et les apéros qu'on a partagés ensemble et surtout pour la bonne ambiance au quotidien. Un spécial merci à l'équipe de nuit Éric, Sévérine et Christiane pour les meilleures gardes.

A Emma et Noémie pour votre implication dans la formation des internes.

A l'équipe d'immunochimie Laure, Hortensia, Joelle, Patricia, Emilie, Bobby et Bibounette pour les nombreux Blind test et les cours de danse de macarena.

A l'équipe de cytogénétique, Merci pour votre bienveillance et vos encouragements pendant ce dernier mois stressant avant le grand jour.

A ma famille,

A mes parents pour vos encouragements, votre amour inconditionnel et pour tous les sacrifices que vous avez fait pour mon frère et moi. Si j'en suis arrivée là aujourd'hui c'est grâce à vous. Merci maman d'avoir toujours cru en moi et d'avoir fait preuve d'un soutien sans faille tout au long de mes études malgré la distance. Merci papa de m'avoir accordé ta confiance et de m'avoir laissé voler de mes propres ailes. Ce que je suis aujourd'hui, je vous le dois. Je vous aime.

A mon petit frère Mr Price, merci pour tous les moments qu'on a passé ensemble pour nos fous rires et nos petites disputes aussi. Merci d'être le petit frère protecteur que tu es.

A Omar, Merci de faire partie de ma vie depuis bientôt 5ans. Merci pour ton aide et ton soutien pendant la préparation du concours d'internat. Et surtout merci de me faire sentir depuis bientôt 3 ans que Paris c'est la porte d'à côté. Je t'aime.

A mes grands-parents paternels mima et azizi, Merci pour tous ces beaux moments passés ensemble. Vous m'avez inculqué le sens de la famille, j'espère aujourd'hui vous rendre fière de là ou vous êtes ! Vous me manquez énormément.

A ma grand-mère Jana, Merci d'être la mamie la plus cool au monde avec qui je peux parler de tout. Merci pour tes conseils ton optimisme et ta joie de vivre. Et surtout merci pour tes délicieux plats préparés comme tu dis avec plein d'amour.

A Lamia, à Paula et à Yannis, Merci de m'avoir accueilli chez vous, d'avoir supporté mes états de stress pendant la PACES. Lamia je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as fait pour moi et d'avoir été à mes côtés lors de chaque étape importante de ma vie. Tu es ma deuxième maman je t'aime...

A mes cousins et cousines, Abir pour nos discussions existentielles jusqu'à 4h du matin et aux films d'horreur que tu m'as obligé de regarder. A Imen pour tes nombreux conseils de mise en beauté que je n'ai pas trop appliqués. A Atef pour nos soirées inoubliables. A Ahmed et Oussama mes deux petits cousins adorés. A Sophia et sa copine Manon. À Yasmine, Malek, Elene et la petite Amely pour tous les bons moments passés ensemble. A Selim et Ines même si les distances nous séparent. Nous avons tous cette incroyable chance d'être unis, continuons ainsi les cousinades, les retrouvailles et les moments de délire à Ben Arous, car je crois que c'est ça le secret du bonheur !

A Seif pour nos longues balades sur les quais de seine, pour tes simulations de trajet à Clermont Ferrand et tes questions existentielles concernant la vitesse du métro parisien et les tonnes de fer nécessaires pour construire la tour Eiffel.

A tous les autres membres de ma famille pour tous les bons moments partagés.

A mes amis et mes co-internes marseillais,

A mes copines du lycée Rania et Asma, pour vos encouragements et votre soutien depuis 13ans. Pour les nombreux moments qu'on a passés ensemble. Pour nos soirées à the view. Merci d'être les amis que vous êtes. J'aurai aimé que vous soyez là aujourd'hui....

A Olfa mon acolyte, quand est-ce qu'on se retrouve à California Chatelet ? tu me manques trop...

A Elizabeth dès nos premiers TP le courant est passé, à Sissi et Aymeric, merci pour tous les moments de fous rires qu'on a passé ensemble spécialement à Prague et notre fameux retour nocturne en Uber. Merci d'avoir relus ce travail.

A Imane l'espagnole, pour ta joie de vivre, pour toutes nos discussions existentielles pendant nos pauses interminables à Odéons. Pour notre danse de la victoire et pleins d'autres souvenirs. Merci d'être l'amie que tu es.

A Valeria, Bogdana, Rayan, Wassim, Wael et tous mes amis du crous, pour les balades nocturnes sur le canal de l'Ourcq et les soirées révisions "charrette" avant les partiels.

A Syrine et Yasmine mes deux copines marseillaises, pour le bébé covid, fruit d'une soirée inoubliable !

A Clara, Marine et Sara (oui tu étais en bioch pas en hémato) mes premières cointernes, j'ai adoré le semestre passé avec vous qui nous a permis de tisser de jolis liens d'amitié

A Antoine et Thomas la meilleure team de biochimie. Pierre, Vincent, est-ce que vous savez comment marchent les ITK ?

A Mathilde pour l'inoubliable semestre d'immuno qu'on a passé ensemble. C'était un réel plaisir de travailler avec toi. Merci pour ton soutien et tes encouragements lors de la rédaction de ce travail. Je suis ravie que nos chemins se soient croisés.

A Marc l'esclave des BK merci de m'avoir tant fait rigoler pendant le semestre à l'IHU

A Maylis pour nos séances de footing sur la corniche qui se terminaient par une bière en terrasse.

A tous mes autres cointernes Marine, Ines, Laurine, Margaux, Nico, Marie, Maria, Sarah, Sylvia merci pour tous les bons moments passés ensemble.

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

« 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. »

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	12
LISTE DES ABRÉVIATIONS	15
LISTE DES FIGURES.....	17
LISTE DES TABLEAUX	18
<i>INTRODUCTION</i>	19
<i>PREMIERE PARTIE : La technologie des CAR-T cells et sa place dans le traitement des Leucémies Aigues Lymphoblastiques B</i>	21
1 Généralités en immunologie	21
1.1 Le système immunitaire	21
1.2 Les lymphocytes T	22
1.3 La synapse immunologique	23
1.4 Le lymphocyte T, une arme efficace contre les cellules cancéreuses	24
1.5 Mécanismes d'échappement tumoral au système immunitaire	26
2 Le développement de l'immunothérapie : les CAR-T cells une révolution du XXI ^{ème} siècle.....	26
2.1 Qu'est-ce qu'un CAR T cells.....	26
2.2 Histoire et développement des CAR-T cells	27
2.3 Structure du récepteur CAR	28
2.3.1 Le domaine extracellulaire	28
2.3.2 Le domaine transmembranaire	29
2.3.3 Le domaine intracellulaire	29
2.4 L'évolution des CAR-T cells, les différentes générations.....	29
2.5 Production des CAR-T cells.....	32
2.5.1 Leucaphérèse.....	32
2.5.2 Activation <i>in vitro</i> des lymphocytes T.....	32
2.5.3 Modifications génétiques des lymphocytes T isolés	32
2.5.4 Culture et multiplication des CAR-T cells	34
2.5.5 Traitement par chimiothérapie et injection des CAR-T cells.....	35
2.6 Source des lymphocytes T	36
2.7 Sélection de la cible des CAR-T cells.....	37
2.8 Les CAR-T cells commercialisés et leurs indications.....	37
3 Les CAR T cells dans les Leucémies Aigues Lymphoblastiques B.....	39
3.1 Les leucémies aigues lymphoblastiques.....	39

3.1.1	Définition.....	39
3.1.2	Epidémiologie :.....	39
3.2	Classification des LAL-B	40
3.2.1	Classification EGIL.....	40
3.2.2	Classification OMS 2016	41
3.3	Pronostic des LAL-B	42
3.4	Prise en charge des LAL-B.....	42
3.5	Place des CAR-T cells anti-CD19 dans la prise en charge des LAL-B de l'enfant et du jeune adulte	44
3.6	Effets secondaires des CAR-T cells anti-CD19 et leurs prises en charge	46
3.6.1	Effets secondaires aigus	46
3.6.2	Effets secondaires retardés	48
3.7	Mécanismes d'échappement tumoral	49
<i>DEUXIEME PARTIE : Suivi des CAR-T cells au laboratoire</i>		51
1	Le devenir des CAR-T cells <i>in vivo</i>	51
2	Les outils du suivi des CAR-T cells au laboratoire.....	53
2.1	Dosage des cytokines et facteurs solubles :	54
2.2	Techniques de biologie moléculaire.....	55
2.3	Suivi des CAR-T cells par cytométrie en flux	56
2.3.1	Principe.....	56
2.3.2	Les réactifs de détection	57
2.3.3	Sensibilité et spécificité des réactifs.....	59
2.4	Recommandations du groupe CARTi et de la Société Francophone de Greffe de Moelle osseuse et de Thérapie Cellulaire (SFGM-TC)	60
3	Expérience du laboratoire d'hématologie du CHU de Marseille.....	62
3.1	Objectifs.....	62
3.2	Matériels et méthodes	62
3.2.1	Patientes.....	62
3.2.1	Protocole :	64
3.2.1.1	Traitement des échantillons :	64
3.2.1.2	Marquage et panels utilisés :	65
3.2.2	Stratégie de fenêtrage.....	67
3.3	Résultats :	68
3.3.1	Caractéristiques des patientes :	68
3.3.2	Comparaison de la cinétique des CAR-T cells chez les deux patientes :	76

3.3.3 Effets indésirables:	78
<i>TROISIEME PARTIE : Discussion</i>	80
<i>Conclusion et perspectives</i>	88
BIBLIOGRAPHIE.....	89

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AC : Anticorps

AMM : Autorisation de mise sur le marché

CAR : Chimeric Antigen Receptor

CD : Cluster de différenciation

CMF : Cytométrie en flux

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : Cellule présentatrice d'antigène

CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat

CSH : Cellules souches hématopoïétiques

EFS : Taux de survie sans évènement

EGIL: European Group for the Immunological Characterization of Leukemias

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

ICANS: Immune effector Cell-Associated Neurotoxicity Syndrome

IL: Interleukine

ITAM: Immuno-receptor tyrosin based activation motive

ITK : Inhibiteur de tyrosine kinase

LAL : Leucémie aigüe lymphoblastique

LB : Lymphocyte B

LCR : Liquide céphalorachidien

LT : Lymphocyte T

MRD : Maladie résiduelle minimale/ mesurable

MO : Moelle osseuse

NK : Natural Killer

OMS : Organisation mondiale de la santé

OS : Taux de survie globale

PCR : Polymerase Chain Reaction

RC : Rémission complète

ScFv Single-chain variable Fragment

SNC : Système nerveux central

SRC : Syndrome de relargage cytokinique

TALEN: Transcription Activator like Effector Nucleases

TCR: T Cells Receptor

TRUCKs: T cell Redirected for Universal Cytokine-mediated Killing

UCART-19 : cellules CAR-T allogéniques

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Structure du TCR associé au CD3	23
Figure 2 : Activation lymphocytaire et synapse immunologique	24
Figure 3 : Cycle de la réponse anti-tumorale des lymphocytes T	25
Figure 4: Structure du CAR	28
Figure 5: Les différentes générations de CAR.....	31
Figure 6: Production des CAR-T cells.....	35
Figure 7: Cinétique du Tisagenlecleucel (Kymriah®)	52
Figure 8: Différentes analyses réalisables en routine pour le suivi immunologique des traitements par CAR-T cells	54
Figure 9: Principales techniques de détection des CAR-T cells par biologie moléculaire	56
Figure 10: Stratégie de détection des CAR-T cells anti-CD19 avec le réactif Miltenyi Biotec.....	58
Figure 11: Les différents réactifs de détection des CAR-T cells anti-CD19	59
Figure 12: Eude de la sensibilité et de la spécificité des différents réactifs	60
Figure 13: Sélection des différentes populations, exemple de la patiente n°2.....	67
Figure 14: Sélection des différentes populations, exemple de la patiente n°2.....	68
Figure 15: Comparaison du profil cinétique des CAR-T cells en pourcentage	77
Figure 16: Comparaison du profil cinétique des CAR-T cells en valeurs absolues.....	77
Figure 17: Détection des CAR-T cells dans le LCR chez la patiente n°1 à J6	79

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification EGIL.....	40
Tableau 2: Classification OMS 2016	41
Tableau 3: Panel d'anticorps utilisés pour la détection des CAR-T cells anti-CD19 sur sang total ou moelle osseuse	65
Tableau 4 : Panel d'anticorps utilisés pour la détection des CAR-T cells anti-CD19 sur la poche de perfusion.....	66
Tableau 5: Panel d'anticorps utilisés pour la détection des CAR-T cells anti-CD19 sur LCR	66
Tableau 6 : Détection des CAR-T cells par cytométrie en flux sur prélèvements de MO chez la patiente n°1 a J24, J91	69
Tableau 7: Détection des CAR-T cells par cytométrie en flux sur prélèvement de LCR chez la patiente n°2 à J6	69
Tableau 8: Suivi des CAR-T cells par cytométrie en flux sur des prélèvements de sang périphérique chez la patiente n°1.....	70
Tableau 9: Suivi des CAR-T cells par cytométrie en flux sur des prélèvements de sang périphérique chez la patiente n°2.....	71

INTRODUCTION

Les progrès réalisés au cours des dernières années ont permis d'établir le rôle essentiel du système immunitaire, principalement des lymphocytes T, dans la surveillance et l'élimination des cellules cancéreuses de l'organisme. Ceci a conduit au développement d'une nouvelle catégorie de traitement, qui vise à stimuler les défenses immunitaires de l'organisme contre les cellules tumorales, appelée l'immunothérapie.

Les hémopathies malignes représentent environ 13% de l'ensemble des cancers. Les nombreuses avancées de l'immunothérapie ont permis d'améliorer la prise en charge de ces pathologies et particulièrement celle des leucémies aiguës lymphoblastiques B (LAL-B), représentant le principal cancer retrouvé chez l'enfant. Le Blinatumomab (Blinicyto®) est le premier anticorps monoclonal bispécifique BiTE (Bi-specific T cell engager) à avoir obtenu l'autorisation de mise sur le marché (AMM) en France dans le traitement des LAL-B CD19 positives réfractaires ou en rechutes chez les enfants à partir de 1 an. Il est caractérisé par sa capacité, à se lier sélectivement au CD19 exprimé à la surface des cellules de la lignée B et au CD3 exprimé par les lymphocytes T. Il permet, par conséquent, d'activer les cellules T endogènes et provoque ainsi l'élimination spécifique des cellules B malignes et saines exprimant le CD19 (1).

La deuxième plus grande avancée de l'immunothérapie qui a permis d'obtenir de meilleurs résultats comparés au Blinatumomab (2), repose sur le développement des lymphocytes T génétiquement modifiés exprimant un récepteur chimérique appelé « CAR » (Chimeric Antigen Receptor). La particularité de ce récepteur est qu'il est composé de la partie variable d'une immunoglobuline monoclonale synthétique, caractérisée par une forte affinité et une capacité à reconnaître un antigène tumoral indépendamment du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Bien que ces cellules CAR-T aient permis d'obtenir des résultats cliniques impressionnants dans le traitement des hémopathies lymphoïdes B, et notamment dans les LAL-B en rechute ou réfractaires aux traitements conventionnels, une forte variabilité interindividuelle de la réponse anti-tumorale, de la durée de la rémission et du développement des effets indésirables ont été observés, justifiant la nécessité de la mise en place d'un suivi personnalisé au laboratoire.

Dans une première partie, nous nous intéresserons au rôle de l'immunité anti-tumorale, au développement des CAR-T cells, à leurs indications dans les LAL-B de l'enfant et du jeune adulte, à leurs effets indésirables et aux principaux mécanismes d'échappement tumoral identifiés. Dans une seconde partie nous aborderons les différentes techniques de suivi des CAR-T cells en prenant l'exemple du protocole utilisé au laboratoire d'hématologie du CHU de la Timone. Enfin, nous étudierons les résultats obtenus chez les deux patientes suivies par cytométrie en flux au sein de notre laboratoire et nous détaillerons les différents facteurs identifiés dans la littérature comme ayant un impact sur l'expansion et la persistance des CAR-T cells, deux mécanismes clés qui déterminent l'efficacité anti-tumorale et le développement des effets indésirables de ces médicaments de thérapie innovante.

PREMIERE PARTIE :

La technologie des CAR-T cells et sa place dans le traitement des Leucémies Aigues Lymphoblastiques B

1 Généralités en immunologie

1.1 Le système immunitaire

Le système immunitaire est un système biologique complexe capable de générer un ensemble varié de cellules et molécules, permettant de préserver l'intégrité de l'organisme par l'élimination de tout élément n'en faisant pas partie ("non soi") ou présentant des anomalies ("soi altéré") (3).

En première ligne des mécanismes de défenses on retrouve l'immunité innée, qui est une réponse immédiate survenant en quelques heures chez tout individu en l'absence d'immunisation préalable. Elle est assurée en grande partie par nos barrières naturelles du corps (les épithéliums), les cellules phagocytaires (les macrophages, les polynucléaires neutrophiles), le système du complément et les lymphocytes NK (*Natural Killer*). C'est une réponse qualifiée de non spécifique (3).

Ensuite, une immunité plus élaborée et spécifique dirigée contre l'agresseur se met en place ; c'est l'immunité adaptative. Il s'agit d'une réponse plus lente qui se développe sur plusieurs jours et qui est composée de deux types :

1. L'immunité à médiation humorale dont les principaux acteurs sont les lymphocytes B (LB) entraînant la production d'anticorps (AC) dirigés contre un antigène spécifique (3).
2. L'immunité à médiation cellulaire qui repose sur l'action cytotoxique des lymphocytes T (3).

1.2 Les lymphocytes T

Les lymphocytes T (LT), dont la lettre « T » provient du « Thymus » organe lymphoïde primaire dans lequel les LT arrivent à maturité, sont responsables de la réponse immunitaire cellulaire spécifique, qui vise à détruire les cellules pathogènes, s'agissant des bactéries ou des cellules cancéreuses (3).

Les lymphocytes T se composent d'un récepteur, le TCR (*T Cells Receptor*), auquel est associé un cluster de différenciation CD3, suivi d'un domaine CD4 ou CD8 en fonction du lymphocyte considéré (3).

Le TCR est un hétérodimère constitué soit par l'association d'une chaîne α et d'une chaîne β (TCR $\alpha\beta$ chez 85% des lymphocytes T circulants), soit par l'association d'une chaîne δ et d'une chaîne γ (TCR $\gamma\delta$), reliées par des ponts disulfures. Chaque chaîne est constituée de deux domaines. Le premier situé en N-terminal, contient le site de reconnaissance de l'antigène. Le second domaine situé en C-terminal est composé d'une courte séquence hydrophobe assurant l'ancrage à la membrane et d'une petite queue intracytoplasmique (3).

Le TCR ne possédant pas de séquence de signalisation intracytoplasmique de type ITAM (*Immuno-receptor Tyrosin based Activation Motive*), il doit être associé au complexe multimoléculaire CD3 qui en est pourvu afin de relayer le signal d'activation du lymphocyte. Le CD3 est constitué de 6 chaînes: une chaîne γ , une chaîne δ , deux chaînes ϵ et deux chaînes ζ (zêta), chacune possédant des motifs ITAMs intracytoplasmiques, composés de tyrosines qui seront phosphorylées par des kinases lors de l'activation lymphocytaire (Figure 1) (3).

Les lymphocytes T CD4 + agissent en tant que cellules auxiliaires et ne reconnaissent que les antigènes liés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II de la cellule présentatrice d'antigène (CPA). Tandis que les cellules T CD8 + sont des cellules cytotoxiques qui ne reconnaissent que les antigènes associés aux molécules du CMH de classe I (4).

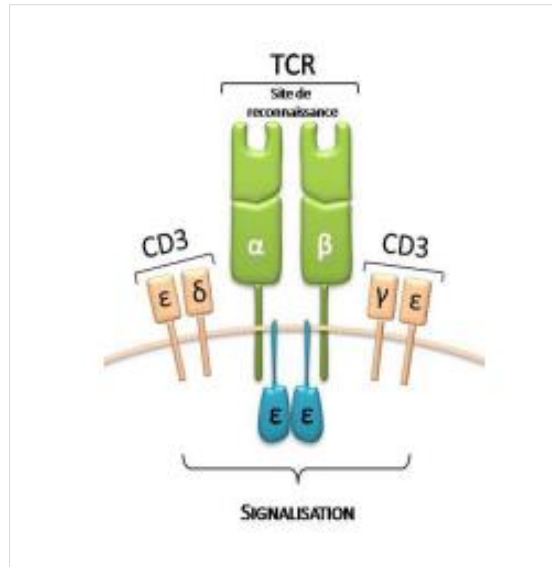


Figure 1: Structure du TCR associé au CD3 (3)

1.3 La synapse immunologique

La réponse immune adaptative, débute par la reconnaissance des antigènes par les lymphocytes T. Elle déclenche la formation de la synapse immunologique, jonction dynamique et hautement structurée entre un lymphocyte T et une cellule présentatrice d'antigène (Figure 2) (4).

L'établissement de cette synapse nécessite 3 signaux :

- Le premier signal s'établit lors de la rencontre d'un fragment antigénique présenté par les glycoprotéines du CMH exprimées à la surface des CPA et du TCR. Cependant, en l'absence de signal supplémentaire le lymphocyte T deviendra anergique (4).
- Cette première étape doit obligatoirement être accompagnée d'un deuxième signal dit de « signal de costimulation » médié par l'interaction entre les molécules de costimulation exprimées par les CPA (CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), CD40...) et leurs récepteurs respectifs exprimés par les LT (CD28, CD40L, OX40L, CD137(4-1BB), CD27 ...) (4).
- Ces deux signaux permettent la formation d'une synapse immunologique, qui sera stabilisée par la présence des molécules d'adhésions (*Intercellular Adhesion Molecule 1/Lymphocyte Function Associated Antigen-1* (ICAM-1/ LFA-1 et LFA-3/CD2))

permettant ainsi d'activer de nombreuses voies de signalisation intracellulaire, aboutissant au troisième signal, dit signal cytokinique. Ce dernier conduit à la sécrétion de cytokines telles que l'interleukine-2 (IL-2), créant un environnement favorable à l'expansion clonale et à la différenciation des lymphocytes T en cellules effectrices (4).

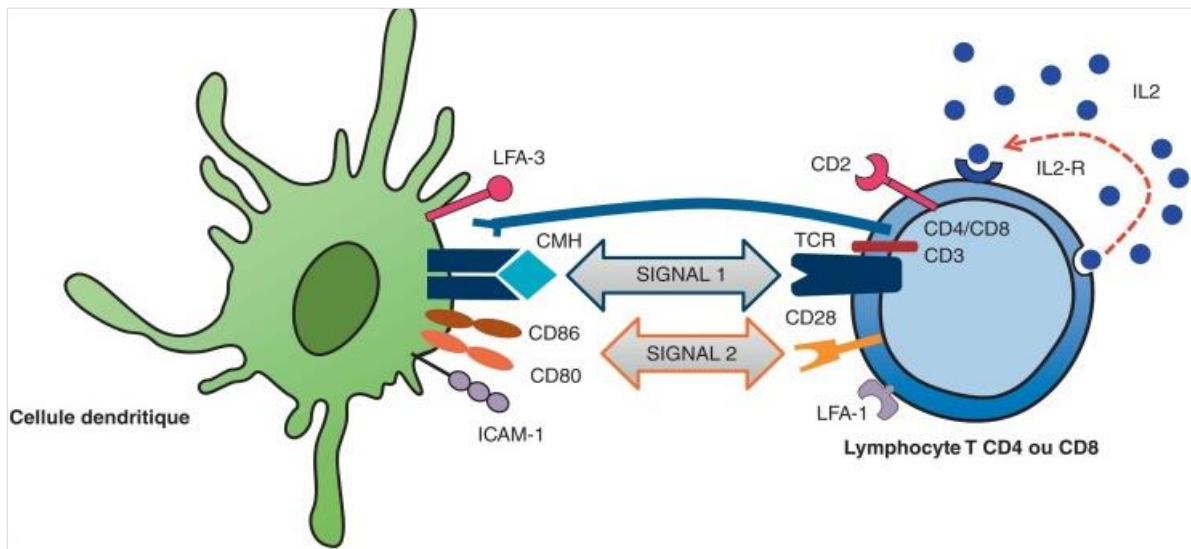


Figure 2 : Activation lymphocytaire et synapse immunologique (4)

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

1.4 Le lymphocyte T, une arme efficace contre les cellules cancéreuses

Les lymphocytes T représentent les acteurs majeurs de l'immunité anti-tumorale (Figure 3). Lors d'une réponse immunitaire idéale, le remodelage du stroma et la production de chimiokines par les cellules tumorales induisent le recrutement des cellules de l'immunité innée ; les macrophages, les cellules NK et les lymphocytes NKT (*Natural Killer T*) qui vont détruire les cellules tumorales. Des antigènes tumoraux vont être libérés et seront captés par les cellules dendritiques pour les dégrader et les présenter sous forme de peptide sur les molécules du CMH. Ces cellules vont ensuite migrer vers les ganglions lymphatiques pour présenter les peptides

tumoraux aux lymphocytes T CD4 et CD8, il s'agit de la première phase dite de reconnaissance (4).

Au cours de la deuxième phase, dite phase effectrice, des lymphocytes T spécifiques de tumeurs, rejoignent le site tumoral et reconnaissent les antigènes tumoraux présentés par les molécules du CMH de classe I des cellules cancéreuses pouvant ainsi détruire directement les cellules tumorales grâce à leurs enzymes effectrices (perforine, granzyme), et à la sécrétion de cytokines cytostatiques telles que TNF alpha (*Tumor Necrosis Factor*) et l'interféron gamma (4) (5).

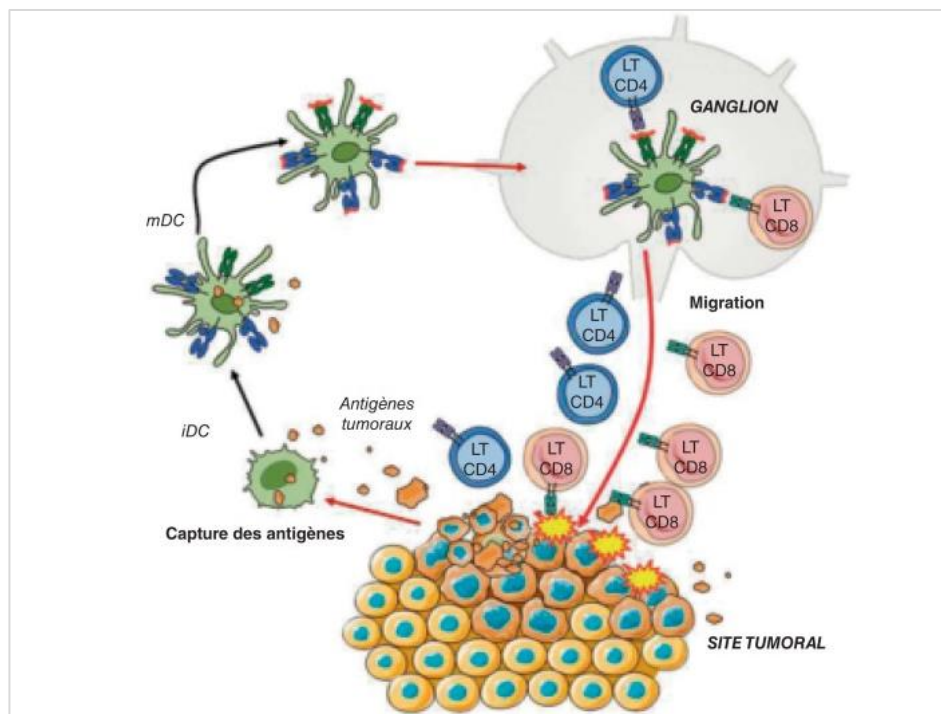


Figure 3 : Cycle de la réponse anti-tumorale des lymphocytes T(5)

Les cellules cancéreuses mourantes libèrent des antigènes tumoraux dans l'environnement tumoral. Ceux-ci sont captés par les cellules dendritiques qui vont les dégrader et les présenter sous forme de peptide sur les molécules du CMH. Les cellules dendritiques migrent ensuite vers les ganglions lymphatiques pour présenter ces peptides tumoraux aux lymphocytes T CD4 et CD8. Les lymphocytes T spécifiques de tumeurs ainsi activés, rejoignent le site tumoral pour exercer leurs fonctions anti-tumorales. (iDC, cellules dendritiques immatures ; mDC, cellule dendritique mature).

1.5 Mécanismes d'échappement tumoral au système immunitaire

À chacune des étapes permettant l'établissement de la synapse immunologique entre le lymphocyte T et la cellule cancéreuse, existent des possibilités de dysfonctionnement, pouvant aboutir à un échappement tumoral vis-à-vis du système immunitaire.

L'un des mécanismes les plus réponsus est celui de la perte d'expression de la molécule CMH du type I au sein de la tumeur, entraînant la disparition du premier signal de reconnaissance antigénique par le TCR (6). Ce phénomène a été décrits dans de très nombreux cancers, et peut être expliqué par le fait, que les cellules tumorales CMH I négatives acquièrent un avantage de survie face à la pression de sélection exercée par le système immunitaire (6).

D'autres mécanismes de résistance ont été décrits tels que l'absence d'expression par la cellule tumorale de molécules de costimulation et d'adhésion, l'absence d'expression d'antigène spécifique de la tumeur ou la sécrétion de cytokines inhibitrices (IL-10, TGF β , FAS L), induisant une apoptose, une inactivation ou une anergie du lymphocyte T et entraînant par conséquent une tolérance du système immunitaire face aux cellules tumorales (6).

Au cours des dernières décennies, grâce à une meilleure compréhension du système immunitaire anti-tumoral et des mécanismes de résistance, une nouvelle catégorie d'immunothérapie par des lymphocytes T génétiquement modifiés est apparue. C'est une voie très prometteuse dans le traitement de cancers à un stade avancé, exploitant les propres cellules du système immunitaire du patient pour reconnaître et détruire sélectivement la tumeur et surmonter les mécanismes d'échappement tumoraux (7).

2 Le développement de l'immunothérapie : les CAR-T cells une révolution du XXI^{ème} siècle

2.1 Qu'est-ce qu'un CAR T cells

Les CAR-T cells, combinant thérapie génique et thérapie cellulaire, constituent une nouvelle forme d'immunothérapie en plein développement (7). Ces molécules appartiennent à une

catégorie de médicaments dénommés « médicaments de thérapies innovante » (MTI) définis dans le règlement européen 1394/2007 (8).

Il s'agit de lymphocytes T, prélevés chez un patient, puis modifiés génétiquement *in vitro* de manière à leur faire exprimer un récepteur artificiel, dit chimérique : le CAR (*Chimeric Antigenic Receptor*). Ce récepteur est conçu de telle manière que sa partie extracellulaire reconnaisse un antigène spécifique et ceci sans qu'il soit présenté par une molécule de CMH, ce qui en fait un concept unique applicable à un large éventail de pathologies tumorales (9).

2.2 Histoire et développement des CAR-T cells

Les premiers CAR-T cells, appelés *T bodies* ont été conçus par Z. Eshar en 1989 (10). Leur évaluation dans des études précliniques réalisées dans les années 1990, avait néanmoins révélé une toxicité sévère ainsi qu'une incapacité à maintenir leur activité cytotoxique *in vivo* (11).

En revanche, en 2003, de nouveaux essais menés *in vitro* et chez l'animal *in vivo*, ont montré le puissant potentiel thérapeutique des CAR-T cells ciblant l'antigène CD19 et avec une structure modifiée par rapport aux premiers essais (12). C'est seulement en 2010 que des cas de régression tumorale impressionnants ont été rapportés dans le cadre d'un essai de phase I, avec des CAR-T cells anti-CD19, utilisé dans le traitement des lymphomes folliculaires B et des leucémies lymphoïdes chroniques (LLC) (13) (14).

La première patiente française, une jeune fille de onze ans atteinte d'une Leucémie Aigüe Lymphoïde de la lignée B (LAL-B) a été guérie de son hémopathie en juin 2016, suite au traitement par des CAR-T cells anti-CD19, dans le cadre de l'essai ELIANA (15) (16).

En 2017 la société *Novartis*, a obtenu l'approbation par la FDA (*Food and drug administration*) aux Etats Unis, du premier médicament CAR-T cells ciblant l'antigène CD19: le Tisagenlecleucel (Kymriah®), destiné à des enfants et des jeunes adultes en échec thérapeutique d'une LAL-B CD19 positive (17).

Cette étape historique a inauguré une nouvelle ère dans la gestion des hémopathies malignes à cellules B réfractaires.

2.3 Structure du récepteur CAR

Les CAR-T cells ont été élaborés de manière à mimer l'activation du lymphocyte T après reconnaissance spécifique d'un antigène tumoral, non pas par son TCR, mais par la partie variable d'une immunoglobuline synthétique. Ainsi, la reconnaissance de l'antigène cible par le CAR est indépendante du CMH. Le CAR est donc un récepteur recombinant entre un BCR (B-Cell-Receptor) et un TCR. Il est constitué d'un domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire (9) (figure 4).

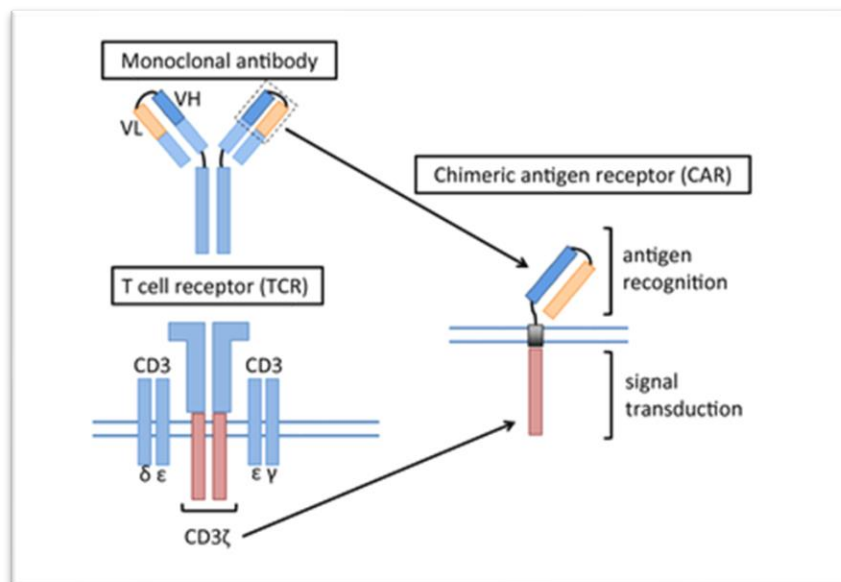


Figure 4: Structure du CAR (18)

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).

2.3.1 Le domaine extracellulaire

C'est la partie du récepteur qui se lie directement à l'antigène cible, sans qu'il soit présenté par une molécule de CMH de classe I. Elle est constituée par la partie variable d'une immunoglobuline (Ig) monoclonale synthétique ScFv (*Single-chain variable Fragment*). Ce

fragment est composé d'un domaine VH (domaine variable de la chaîne lourde) relié par un court polypeptide flexible au domaine VL (domaine variable de la chaîne légère) (9).

Le choix du domaine extracellulaire sera responsable de l'affinité et de la spécificité du récepteur pour l'antigène tumoral. Les domaines extracellulaire et transmembranaire sont reliés par un connecteur dit « charnière » assurant la flexibilité, dont la nature et la longueur influencent l'activité des CAR-T cells (19).

2.3.2 Le domaine transmembranaire

Cette partie assure l'ancrage du récepteur dans la membrane plasmique du lymphocyte T, la stabilisation et la transduction du signal (9).

2.3.3 Le domaine intracellulaire

Le domaine intracellulaire est impliqué dans la signalisation lymphocytaire T. Il est composé de motifs ITAMs du complexe CD3 ζ (zêta), permettant l'activation intracellulaire des lymphocytes T lors de la liaison à l'antigène cible (9). En fonction des différentes générations des CAR-T cells, il peut s'y ajouter un ou plusieurs domaines de costimulation différents (CD28, CD27, ICOS, OX40/CD134,4-1BB(CD137)) dans le but d'améliorer la prolifération, la persistance *in vivo* de ces cellules T modifiées et la mobilisation des autres acteurs de la réponse immunitaire (9).

2.4 L'évolution des CAR-T cells, les différentes générations

Afin de reproduire les signaux d'activation lymphocytaire sans utiliser le recours initial « classique » du TCR, différentes générations de CAR ont été développées :

- **1ère génération**

Comme décrits précédemment, les CAR de 1ère génération sont composés d'une région variable (ScFv) d'immunoglobuline monoclonale d'origine murine reconnaissant l'antigène cible, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire de signalisation composé uniquement de molécules CD3 ζ (partie de la molécule CD3 qui transmet le signal TCR-CD3). L'expérimentation *in vivo* de ces CAR-T cells dans les modèles animaux a démontré que le niveau d'activation et d'expansion étaient insuffisants pour produire une réponse anti-tumorale efficace et durable (20).

- **2ème génération**

Une seconde génération de CAR a été développée pour optimiser l'activation, la survie et la fonctionnalité *in vivo* des CAR-T cells. L'innovation de cette nouvelle génération a été d'ajouter à la chaîne CD3 ζ un domaine de costimulation, le plus souvent CD28 ou 4-1BB (CD137) (21). Les profils cytotoxiques et métaboliques de ces CAR-T cells diffèrent selon le domaine de costimulation. Par exemple, les CAR avec un domaine 4-1BB (CD137) semblent montrer une moindre activité cytotoxique mais aussi une meilleure longévité par rapport aux CAR-T cells portant le domaine CD28 (22).

- **3ème génération**

Les CAR de 3ème génération combinent plusieurs domaines de costimulation, tels que CD28, 4-1BB(CD137), ICOS, OX40(CD134). La présence de plusieurs signaux de costimulation permet d'augmenter l'activité anti-tumorale avec une production plus élevée de cytokines, une activité cytotoxique plus importante et plus spécifique, ainsi qu'une capacité d'expansion cellulaire et de persistance *in vivo* augmentées (23).

- **4ème génération**

Dans cette génération, l'innovation est apportée par la présence d'un transgène inducible par la reconnaissance de l'antigène cible par le CAR entraînant la sécrétion de cytokines ou d'autres

ligands activateurs. Ce type de CAR-T cells est appelé TRUCKs (*T cell Redirected for Universal Cytokine-mediated Killing*) (24).

L'exemple le plus étudié à ce jour est celui des TRUCKs sécrétant l'IL-12, cytokine qui favorise :

- L'activité cytotoxique des lymphocytes T.
- L'activation et la différenciation des lymphocytes antitumoraux.
- La protection des CAR-T cells du micro-environnement tumoral inhibiteur.
- Le recrutement des autres cellules immunitaires qui accompagnent l'activité anti-tumorale des CAR-T cells (25).

L'avantage de l'utilisation de ce type de construction est que l'IL-12 est produite aussi longtemps que le lymphocyte génétiquement modifié reconnaissant la cible.

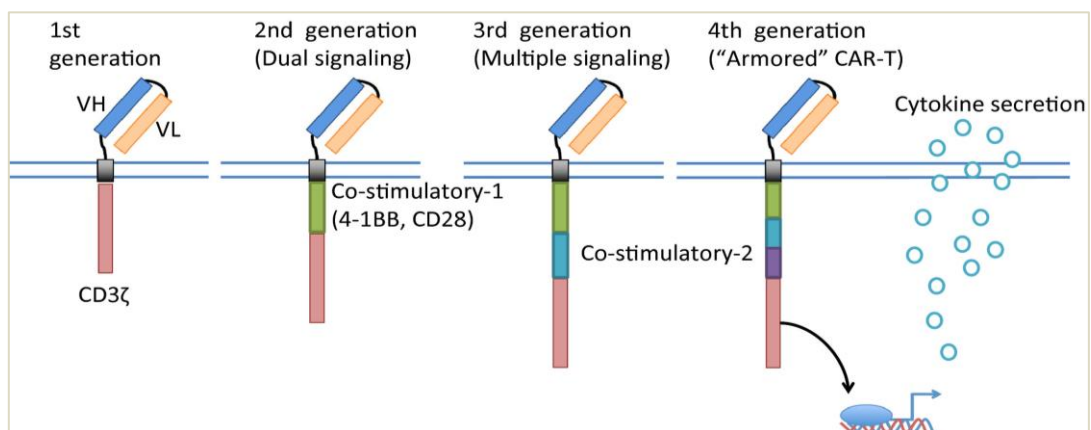


Figure 5: Les différentes générations de CAR(18)

La conception initiale du CAR de 1ère génération a évolué vers les générations suivantes par l'incorporation d'un domaine de costimulation CD28 ou 4-1BB représentant les CAR-T cells de 2ème génération. De deux domaines de costimulation intracellulaires (CD28,4-1BB, ICOS, OX40) dans la 3ème génération, ou l'incorporation supplémentaire d'un transgène de cytokine inductible dans les CAR-T cells de 4^{ème} génération.

2.5 Production des CAR-T cells

La production de CAR-T cells destinés à cibler un antigène tumoral spécifique, repose sur le respect de règles des 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.

La fabrication des CAR-T cells commence par le prélèvement des lymphocytes T du patient (autologue) qui vont ensuite subir *ex vivo* des modifications génétiques pour être par la suite réinjectés chez le même patient. Ce processus s'effectue en 5 étapes (Figure 6) (26).

2.5.1 Leucaphérèse

La leucaphérèse est un processus qui consiste à isoler à partir du sang périphérique les globules blancs du patient. Une fois prélevées, ces cellules seront ensuite triées en fonction de leur taille et leur densité afin d'extraire les lymphocytes T CD3 positifs. Après séparation, ces cellules peuvent soit être utilisées directement soit être cryoconservées pour une utilisation future (27).

2.5.2 Activation *in vitro* des lymphocytes T

Une fois isolés, les lymphocytes T sont ensuite activés et stimulés grâce à des billes magnétiques recouvertes d'anticorps monoclonaux anti-CD3 et anti-CD28. Ceci permet l'expansion *ex vivo* des LT, indispensable pour les modifications génétiques ultérieures (27).

2.5.3 Modifications génétiques des lymphocytes T isolés

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

- **Stratégie virale** : Transduction (processus de transfert de gène en utilisant un vecteur viral)

Cette technique utilise la capacité naturelle des rétrovirus de s'introduire dans le noyau des cellules cibles et d'y intégrer par un mécanisme de transduction virale du matériel génétique codant pour le CAR. 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. Les gamma-rétrovirus et les lentivirus sont les deux sous-types viraux les plus utilisés dans les essais cliniques et thérapies cellulaires nécessitant un transfert de gènes. La différence majeure entre les deux types est que, les gamma-rétrovirus ne peuvent infecter que les cellules en cours de division cellulaire alors que les lentivirus peuvent infecter des cellules quiescentes ce qui explique leur plus large utilisation (27).

Les vecteurs lentiviraux et gamma-rétroviraux ont tous les deux l'avantage d'être hautement efficaces et de permettre l'expression d'un récepteur CAR stable. Cependant ces vecteurs viraux intégratifs, peuvent s'insérer dans des unités impliquées dans la division cellulaire et être à l'origine d'apparition d'oncogène par un phénomène de mutagénèse insertionnelle. Ce phénomène n'a pour l'instant pas été observé avec les CAR-T cells, mais afin d'éliminer totalement ce risque, des vecteurs viraux non-intégratifs NIVL (*non-integrating lentiviral vector*) sont en cours d'étude (28).

L'ensemble des CAR-T cells actuellement commercialisés, sont produits en utilisant un vecteur viral, lentivirus ou rétrovirus (29).

- **Stratégie non virale**

Afin de réduire les risques de toxicité et de mutagénèse, de nouvelles stratégies recourant à des vecteurs non viraux sont en cours d'exploration. Ces différents systèmes incluent des systèmes physiques (comme l'électroporation) ou chimiques (comme les nanoparticules).

L'électroporation est actuellement la technique non virale la plus étudiée. Elle consiste à appliquer un courant électrique sur les cellules dans le but d'augmenter la perméabilité cellulaire afin de permettre l'introduction de vecteurs non-viraux 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) sont en cours d'étude. Une faible toxicité, un coût relativement faible et une procédure de fabrication simplifiée ont été constatés lors de l'utilisation du système transposon/ transposase de type *sleeping beauty* pour la conception des CAR ciblant l'antigène CD19 (30).

Plus récemment, une nouvelle stratégie basée sur l'introduction à l'intérieur du lymphocyte T, par électroporation ou par endocytose (mécanisme par lequel la cellule internalise une molécule externe), d'un ARN messager codant pour le CAR a été développée. La particularité de ce système est que le transgène n'est pas intégré au génome et son expression est transitoire d'environ quelques semaines. Cette approche pourrait être intéressante pour limiter l'effet cytotoxique sur des cellules saines exprimant l'antigène d'intérêt (effet dit « on target/off tumors ») (29).

L'utilisation des nanoparticules est également une stratégie en plein développement, principalement dans les essais sur les tumeurs solides (31). Ces particules contenant le gène codant pour le CAR d'intérêt, sont directement injectées chez le patient et vont cibler les lymphocytes T (CD3+) grâce à leurs enveloppes contenant des fragment Fab qui vont reconnaître le corécepteur CD3 et s'introduire à l'intérieur des LT par endocytose (29). Ils vont ensuite libérer leur contenu qui sera intégré dans le génome de LT par le système transposon/transposase *piggyBac*. Ces nanoparticules peuvent reprogrammer *in vivo* les lymphocytes T et leur faire exprimer un CAR. Le recours à la nanotechnologie est prometteur par son efficacité et son potentiel de réduction des coûts et du délai de production. Toutefois la sécurité de cette approche doit être encore évaluée chez l'homme (31).

2.5.4 Culture et multiplication des CAR-T cells

Afin d'obtenir une dose thérapeutique suffisante, les CAR-T cells obtenues sont ensuite multipliées en utilisant des milieux de cultures cellulaires optimisés nécessitant des fermenteurs, des cellules artificielles et des interleukines (IL-2, IL-21), favorisant la stimulation et la division cellulaire. Une fois les cellules CAR-T en nombre suffisant, celles-ci sont cryoconservées et expédiées au centre d'administration du patient (27).

Plusieurs études ont montré que l'utilisation d'IL-2 favorise la différenciation des lymphocytes T vers un phénotype effecteur mémoire caractérisé par des cellules différenciées avec des propriétés cytotoxiques croissantes au détriment de leur capacité proliférative. Tandis que l'utilisation d'IL-7 et IL-15 paraît plus intéressante pour générer des cellules CAR-T moins différenciées avec une meilleure capacité de prolifération *in vivo* après réinjection chez le patient (32).

2.5.5 Traitement par chimiothérapie et injection des CAR-T cells

Avant l'injection, le patient reçoit une chimiothérapie lymphodéplétive (sauf si son taux de globules blancs au cours de la semaine précédant la perfusion est $\leq 1\ 000$ cellules/ μL). En effet, les études précliniques et cliniques ont montré que la prolifération homéostatique et la persistance des lymphocytes T sont augmentées par une lymphodéplétion pré-perfusion, se faisant principalement par l'administration de l'association cyclophosphamide et fludarabine (33).

Une fois dans l'organisme, les cellules CAR-T vont cibler les cellules tumorales de manière spécifique grâce à leur récepteur CAR, s'activer puis les détruire.

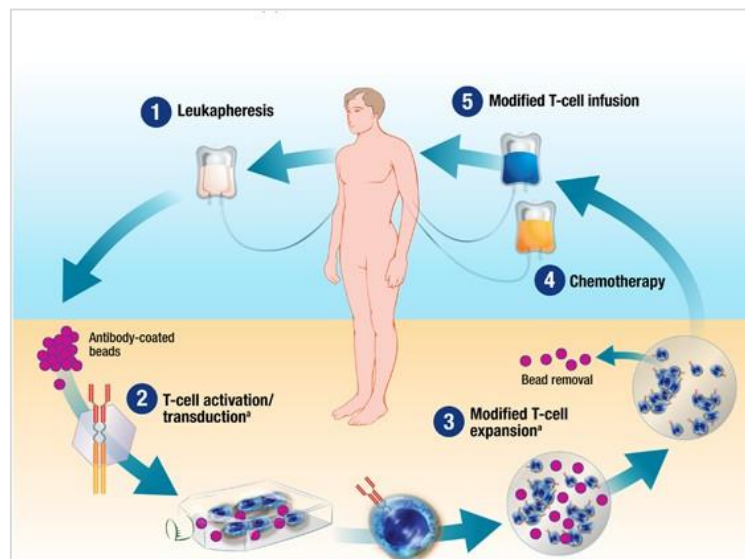


Figure 6: Production des CAR-T cells(26)

2.6 Source des lymphocytes T

Les thérapies actuelles à base de CAR-T cells, utilisent des lymphocytes T issus du patient à traiter ; lymphocytes autologues. Cependant, cette approche est associée à un certain nombre d'inconvénients qui pourraient limiter potentiellement leur utilisation (34) :

- Un processus de fabrication long (4 à 5 semaines) et complexe, entraînant la nécessité de mettre en place une thérapeutique d'attente.
- Une difficulté à obtenir un nombre suffisant de lymphocytes T, notamment chez les patients lourdement prétraités et lymphopéniques (35).
- Un risque théorique de contamination par des cellules tumorales.
- Un nombre limité de CAR-T cells produits, rendant difficile la réinjection.

Le développement de CAR-T cells allogéniques offre la possibilité de s'affranchir de ces limites. Pour pouvoir utiliser des lymphocytes T allogéniques, il est nécessaire d'invalider l'expression du TCR endogène et du CMH afin d'éviter le développement d'une réaction du greffon contre l'hôte (GVH) et de diminuer le risque de rejet (36).

Les stratégies d'invalidation les plus étudiées sont :

- Le système TALEN (*Transcription Activator like Effector Nucleases*) permettant de couper précisément certaines régions de l'ADN (36) (38)
- Le système CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*), plus récemment développé, comprenant un petit ARN guide (gRNA) capable de reconnaître une séquence d'ADN cible et une nucléase Cas9, qui clive spécifiquement cet ADN reconnu (36).

La société française Cellectis a été la première à développer ce type de cellules CAR-T allogéniques : UCART-19 (ciblant l'antigène CD19), utilisant le système TALEN pour invalider l'expression du TCR et du CD52, rendant les CAR-T cells insensibles à l'alemtuzumab (AC anti-CD52) (38). Les premiers résultats de l'essai clinique PALL de phase 1 utilisant les UCART-19 dans les LAL-B réfractaire ou en rechutes chez l'enfant sont encourageants au niveau de l'innocuité et de l'efficacité. Cependant la persistance *in vivo* de ces cellules est très limitée, nécessitant de développer de nouvelles générations qui pourraient persister plus longtemps de manière à maintenir un nombre suffisant de cellules dans le temps (34) (39).

2.7 Sélection de la cible des CAR-T cells

Idéalement, la cible du CAR doit être exprimée de façon uniforme, importante et sélective sur les cellules tumorales afin d'obtenir une efficacité optimale et limiter les effets cytotoxiques vis-à-vis des cellules saines (effet dit *on target/off tumor*).

De nombreuses cibles ont été sélectionnées ; la plus utilisée en thérapeutique actuelle dans les hémopathies lymphoïdes B, est l'antigène CD19. C'est une cible idéale car son expression est limitée aux cellules de la lignée B. Elle n'est pas exprimée par les cellules souches hématopoïétiques ni par la plupart des autres tissus normaux. Ainsi la toxicité vis-à-vis des cellules saines se traduit par une aplasie de la lignée B et une hypogammaglobulinémie, entraînant un risque infectieux, pouvant être résolu par une prophylaxie médicamenteuse et vaccinale. Devant la perte fréquente de l'expression de l'antigène CD19 par les cellules tumorales, d'autres cibles exprimées par les clones B sont en cours d'étude : CD20, CD22, CD23 (40).

Des cibles potentielles, dans le myélome (SLAMF7, BCMA), les lymphomes T (CD5, CD7), les hémopathies myéloïdes (CD123, CD33, FLT3) et les cancers solides (HER2, NKG2D) sont également en cours de développement. Cependant, il est très difficile de trouver des antigènes exclusivement exprimés par les cellules tumorales pour épargner au maximum les cellules saines (34).

2.8 Les CAR-T cells commercialisés et leurs indications

Les CAR-T cells ont essentiellement démontré leur efficacité dans les hémopathies malignes lymphoïdes B, grâce à de nombreux essais cliniques : ELIANA, ENSIGN, ZUMA-1, JULIET. Actuellement, il existe 4 médicaments qui ont obtenu l'AMM en Europe. Il s'agit de CAR-T cells de 2^{ème} génération, produits à partir de lymphocytes T autologues génétiquement modifiés *ex vivo* au moyen d'un vecteur viral codant pour un CAR ciblant l'antigène CD19 et comportant un domaine de costimulation 4-1BB (CD137) ou CD28.

Tisagenlecleucel (Kymriah®), 1^{ère} CAR-T cells portant le domaine de costimulation 4-1BB à avoir obtenu l'AMM européenne en 2018 (17). Il est indiqué dans le traitement des :

- Enfants et jeunes adultes jusqu'à 25 ans inclus atteints de leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) à cellules B réfractaire, en rechute après greffe ou après la deuxième rechute ou plus (essai ELIANA, NCT02435849) (15) (41).
- Adultes atteints de lymphome diffus à grandes cellules B en rechute ou réfractaire après la deuxième ligne ou plus d'un traitement systémique (essai JULIET, NCT02445248) (42).

Axicabtagene ciloleucel (Yescarta®), 2^{ème} CAR-T cells portant le domaine de costimulation CD28 à avoir obtenu l'AMM européenne en 2018. Indiqué dans le traitement des patients adultes atteints de :

- Lymphome diffus à grandes cellules B
- Lymphome médiastinal primitif à grandes cellules B réfractaire ou en rechute, après au moins deux lignes de traitement systémique (essai ZUMA-1) (43).

Brexucabtagene autoleucel (Tecartus®), approuvé en 2021 pour le traitement des patients adultes atteints de :

- Lymphome du manteau réfractaire ou en rechute après au moins deux lignes de traitement systémique, dont un traitement par un inhibiteur de tyrosine kinase de Bruton (BTK) (44).

Lisocabtagene maraleucel (Breyanzi®), dernier CAR-T cells à avoir été approuvé récemment en Europe. Son efficacité et son innocuité ont été évaluées dans l'essai multicentrique TRANSCEND (NCT02631044) (45)(46). Il est indiqué dans le traitement des patients adultes atteints de :

- Lymphome à grandes cellules B récidivant ou réfractaire après deux lignes ou plus de traitement systémique, y compris le lymphome diffus à grandes cellules B, lymphome à cellules B de haut grade, lymphome médiastinal primitif à grandes cellules B
- Lymphome folliculaire de grade 3B.

Idacabtagene vicleucel (Abecma TM®), CAR-T cells anti-BCMA en cours d'essai clinique en Europe, indiqué dans le traitement du myélome multiple de l'adulte en rechute ou réfractaire au traitement conventionnel (47).

3 Les CAR T cells dans les Leucémies Aigues Lymphoblastiques B

3.1 Les leucémies aigues lymphoblastiques

3.1.1 Définition

Le terme « leucémie » est employé pour la première fois en 1845 par Rudolf Virchow, un médecin allemand, qui décrit un envahissement du sang par les globules blancs (« sang blanc ») (48).

Les Leucémies Aigues Lymphoblastiques (LAL) résultent d'une prolifération clonale anormale des précurseurs hématopoïétiques de nature lymphoïde. Ces cellules immatures appelées lymphoblastes, sont bloquées à un stade précoce de leur différenciation et envahissent la moelle osseuse, le sang, les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions) et les organes extra-hématopoïétiques (foie, testicules, système nerveux central...) entraînant des cytopénies périphériques (anémie, thrombopénie, neutropénie) et un syndrome tumoral responsables des manifestations cliniques (49).

L'OMS a établi un critère majeur permettant de porter le diagnostic de leucémie aigüe en définissant un pourcentage de blastes \geq à 20% dans la moelle osseuse (50).

3.1.2 Epidémiologie :

Les LAL ont une incidence proche de 1,5 cas pour 100 000 habitants/an, soit environ 1000 nouveaux cas diagnostiqués par an en France. Elles représentent 80% des leucémies aigues de l'enfant et 20% de celles de l'adulte, avec 2 pics de fréquence : chez l'enfant de 2 à 10 ans dont environ 75% des cas sont diagnostiqués avant l'âge de 6 ans et chez l'adulte à partir de 50 ans (51).

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

- Les LAL-B, les plus fréquentes, représentent environ 85% des cas chez l'enfant.
- Les LAL-T, représentent 10-15% des cas et sont de moins bon pronostic.
- Les LAL mixtes, représentent moins de 5% des cas et sont généralement de mauvais pronostic (51).

La suite de ce travail concernera exclusivement les LAL-B, sachant que ce sont les cellules de la lignée B qui seront ciblées par les CAR-T cells via le marqueur CD19.

3.2 Classification des LAL-B

3.2.1 Classification EGIL

L'immunophénotypage est devenu un examen indispensable au diagnostic des leucémies aiguës lymphoïdes comme myéloïdes (LAM). En 1995, une première classification officielle a été établie : la classification EGIL (52).

Cette classification repose sur l'immunophénotypage des cellules blastiques en reprenant les marqueurs des stades normaux de maturation dans la moelle osseuse et le thymus. Les LAL-B sont caractérisées par la positivité de plusieurs marqueurs spécifiques de la lignée B présents tout au long de leur maturation, ce sont les marqueurs panB : CD19, cCD79a et CD22. Une fois l'assignation du blaste à la lignée B, la classification EGIL va s'effectuer selon la positivité ou non de différents marqueurs qui se succèdent durant la période de maturation du lymphoblaste (52).

	c-CD79a, CD19, CD22	CD10	c-IgM	s-IgM
B I (pro-B)	+	-	-	-
B II (commune)	+	+	-	-
B III (pré-B)	+	+/-	+	-
B IV (B mature)	+	+/-	+/-	+

Tableau 1 : Classification EGIL (52)

3.2.2 Classification OMS 2016

De nombreuses anomalies cytogénétiques récurrentes ont été identifiées dans les LAL-B, permettant d'établir en 2001 une nouvelle classification par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), révisée en 2008 puis en 2016 (53). Cette classification se divise en deux classes :

- Les LAL-B non associées à des anomalies cytogénétiques récurrentes.
- Les LAL-B associées à des anomalies cytogénétiques récurrentes (Tableau 2).

La recherche de ces anomalies cytogénétiques est devenue indispensable au diagnostic car elles influent sur la nature du traitement et conditionnent le pronostic. Cette nouvelle classification a permis de regrouper les leucémies aiguës, ainsi que les lymphomes lymphoblastiques pour lesquels la blastose est inférieure à 20% mais où le syndrome tumoral prédomine. Ces deux formes cliniques sont donc assimilées comme une seule entité d'un point de vue pronostic et thérapeutique (53).

Anomalie cytogénétique récurrente	Correspondance moléculaire	Pronostic
t(9;22)(q34;q11.2)	BCR-ABL1	Défavorable
t(v;11q23)	KMT2A(MLL)	Défavorable
t(12 ;21)(p13.2 ;q22.1)	ETV6-RUNX1	Favorable
Hyperdiploidie		Favorable
Hypodiploidie		Défavorable
t(5 ;14)(q31.1 ;q32.3)	IL3-IGH	Défavorable
t(1 ;19)(q23 ;p13.3)	TCF3-PBX1	Favorable
Amplification intrachromosomique sur le chromosome 21 : iAMP21		Défavorable
Translocation impliquant des tyrosines kinases ou des récepteurs de cytokines	BCR-ABL1 like	Défavorable

Tableau 2: Classification OMS 2016 (53)

3.3 Pronostic des LAL-B

Le pronostic des enfants atteints de LAL-B s'est progressivement amélioré pour atteindre des taux de survie à 5 ans de plus de 90 %. Ces résultats déclinent avec l'âge des patients et la survie à 5 ans des adultes (18-60ans) n'est plus que de 50 %, et moins de 25% pour les plus de 60 ans (1).

L'influence de l'âge sur le pronostic est fortement liée aux caractéristiques cytogénétiques des LAL-B, à la prise en charge et à la capacité de tolérance face à la toxicité des traitements (1). Plus de la moitié des enfants sont diagnostiqués avec des anomalies cytogénétiques de bon pronostic : translocation t(12;21) (fusion ETV6-RUNX1) et caryotype hyperdiploïde. Ces anomalies sont rares chez l'adulte où elles représentent 5 à 10 % des cas. Inversement, la fréquence des LAL-B avec chromosome de Philadelphie (Ph+, t(9;22), fusion *BCR-ABL1*), anomalie classée de mauvais pronostic, augmente avec l'âge. Elle est retrouvée chez moins de 5 % des enfants et plus de 25 % des adultes. Cependant l'apparition des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) a profondément révolutionné la prise en charge de ces patients.

Il existe d'autres anomalies de pronostiques défavorables tels que les fusions des gènes KMT2A (MLL) dans les LAL pro-B, le caryotype hypodiploïde, les réarrangements du locus IGH, mais aussi deux entités provisoires incluses en 2016 dans la classification OMS : les LAL-B *BCR-ABL like* (Ph *like*) et LAL-B avec amplifications intra chromosomiques du 21 (iAMP21). La fréquence de ces anomalies augmente chez les patients jeunes, âgés de 15 à 25ans, tranche d'âge regroupée sous le terme « adolescent et jeune adulte » nécessitant ainsi des schémas thérapeutiques plus intensifs et plus toxiques inspirés généralement des protocoles pédiatriques («pédiatrisation des protocoles») (1) (53).

3.4 Prise en charge des LAL-B

Une fois la LAL-B diagnostiquée, le traitement doit démarrer immédiatement car la pathologie évolue très rapidement. La durée du traitement est en moyenne de 2 à 3 ans et repose essentiellement sur l'administration d'une polychimiothérapie répartie en 3 phases différentes : induction, consolidation, entretien.

La chimiothérapie est précédée d'une pré-phase de corticoïdes d'une semaine, permettant de juger de la corticosensibilité de la maladie, d'attendre sa caractérisation cytogénétique et/ou moléculaire (en pratique Ph+ ou Ph-) et de prévenir le syndrome de lyse tumorale (54) (55).

- **Phase d'induction**

Elle dure environ 35 jours et nécessite une hospitalisation. L'objectif est de détruire un maximum de cellules leucémiques afin d'obtenir une rémission cytologique complète qui est définie par un nombre de blastes < 5% au myélogramme. Généralement, des corticoïdes sont associés avec quatre molécules de chimiothérapie : Cyclophosphamide, Vincristine, Daunorubicine et L-asparaginase. Un inhibiteur de tyrosine kinase (Glivec®) peut être associé également chez les patients présentant un chromosome Philadelphie ou une anomalie voisine nommée *Ph-like*.

La mesure de la maladie résiduelle (MRD) à la fin de cette phase va déterminer le taux des cellules leucémiques résiduelles (qu'on ne voit pas au microscope). Ce taux va conditionner la suite de la prise en charge, raison qui peut conduire à une modification de protocole thérapeutique en cas de mauvaise réponse et d'envisager une greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) (54) (55).

- **Phase de consolidation**

D'une durée de 6 à 10 mois, cette deuxième phase de traitement peut être réalisée en hôpital de jour et vise à éradiquer la maladie résiduelle submicroscopique qui demeure après l'obtention d'une rémission cytologique complète. Le traitement repose sur l'administration d'une association de différentes molécules en fonction des protocoles (cyclophosphamide, étoposide, méthotrexate, 6-mercaptopurine, cytarabine...) (54) (55).

- **Phase d'entretien**

Pendant 12 à 24 mois, le patient reçoit un traitement à base de méthotrexate et de 6-mercaptopurine. Il peut alors reprendre une vie normale. Cependant, il garde une certaine fragilité par rapport aux infections et une évaluation médicale urgente reste nécessaire en cas de symptômes infectieux.

Un des risques des LAL-B est l'atteinte du système nerveux central (SNC) par les cellules leucémiques. Un traitement préventif par des injections intrathécales de méthotrexate est réalisé régulièrement chez ces patients lors des ponctions lombaires (54) (55).

La greffe de CSH est une thérapeutique complexe et lourde à mettre en œuvre nécessitant de mettre en aplasie le patient. Elle est surtout réalisée dans le cadre des LAL-B de mauvais pronostic, après une rechute ou lors d'une résistance au traitement. Le but est d'éliminer les cellules leucémiques résiduelles du receveur qui seront détruites par les lymphocytes d'un donneur compatible, mais aussi de remplacer la moelle osseuse du patient par une moelle ne possédant pas des cellules tumorales.

À la fin de ces 3 phases de traitement et pendant au moins 5ans suivant le diagnostic, une surveillance régulière est requise afin de dépister toute rechute éventuelle (54).

3.5 Place des CAR-T cells anti-CD19 dans la prise en charge des LAL-B de l'enfant et du jeune adulte

Chez les patients pédiatriques traités pour une LAL-B, le taux de survie à 5ans est supérieur à 90%. Cependant, 15 à 20 % de ces patients présenteront une rechute, nécessitant alors une chimiothérapie de rattrapage intensive et une allogreffe de CSH dans la majorité des cas, permettant de sauver environ 30 à 50 % de ces enfants (56).

En cas de rechutes ultérieures ou de maladie réfractaire, le pronostic est beaucoup plus péjoratif et la guérison est rare allant de 0 à 15%. A ce stade de la maladie, l'allogreffe de CSH est recommandée si elle n'a pas été effectuée 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 aux 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 anti-CD19. De très nombreux essais cliniques ont été réalisés dans le but, d'étudier l'efficacité et la sécurité de ces thérapies innovantes. Des résultats satisfaisants ont alors été observés :

- **L'essai ENSIGN (NCT02228096)**

L'étude ENSIGN est une étude de phase I/II multicentrique, réalisée aux Etats-Unis et ayant recruté un total de 35 patients au moment de la clôture des données au 1er février 2016. L'objectif principal de cette étude était d'évaluer le pourcentage de rémission complète au cours des 6 mois après l'administration du Tisagenlecleucel (Kymriah®).

Des résultats cliniques très prometteurs ont été observés. Le pourcentage de rémission globale à 6 mois était de 62% chez 29 patients qui ont reçu une seule injection de Tisagenlecleucel (Kymriah®). Les taux de survie sans évènement (EFS) et de survie globale (OS) étaient respectivement de 66 % et 76 % à 6 mois (57).

- **L'étude Seattle children's (NCT02028455)**

Il s'agit d'une étude prospective réalisée à Seattle incluant 45 patients âgés de 12ans (âge médian). 43 patients ont pu recevoir une injection de Tisagenlecleucel (Kymriah®), après une chimiothérapie de lymphodéplétion comprenant du cyclophosphamide seul (n= 27) ou en association avec de la fludarabine (n = 14). Le suivi médian était de 9,6 mois. Une MRD indétectable a été obtenue chez 89 % des patients 21 jours après injection. Les taux de survie sans évènement (EFS) et de survie globale (OS) étaient respectivement de 51 % et 66 % à 12 mois (57).

- **L'essai ELIANA (NCT02435849)**

L'étude ELIANA est une étude pivot de phase II, menée dans 25 centres internationaux et réalisée entre le 8 avril 2015 et le 8 avril 2018. Cette étude a été menée dans le but de tester l'efficacité et la toxicité du Tisagenlecleucel (Kymriah®) chez les patients pédiatriques et les jeunes adultes atteints de LAL-B en première rechute post greffe, en deuxième rechute ou plus ou réfractaires aux traitements conventionnels (16).

Dans cet essai, 92 patients âgés de 3 à 21 ans ont été inclus dont 75 patients ont reçu une seule injection de Tisagenlecleucel (Kymriah®) après une chimiothérapie lymphodéplétive par fludarabine-cyclophosphamide (15).

Une rémission complète a été obtenue chez 64 patients (81%) et une MRD indétectable par cytométrie en flux chez 63 patients (98%) à 3 mois de traitement. Les taux de survie sans évènement (EFS) et de survie globale (OS) étaient respectivement de 66 % et 70 % à 18 mois (57) (58).

A l'issue de cette étude il a été mis en évidence qu'une seule perfusion de Kymriah® a permis d'obtenir une rémission sans entraîner d'effets secondaires graves. Il s'agit du premier CAR-T cells anti-CD19 utilisé en clinique et approuvé en 2017 par la FDA. Il constitue 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} rechute (41).

L'ensemble de ces essais a permis de prouver que les CAR-T cells anti-CD19 représentent un réel espoir pour les patients de mauvais pronostic ou en impasse thérapeutique après plusieurs lignes de traitements. Toutefois, la comparaison des résultats de ces différentes études demeure difficile en raison des variations des critères d'inclusion tels que : les caractéristiques des patients inclus (âge, prétraitement ou non par d'autres anti-CD19 tel que le Blinatumomab (Blinicyto®), le type de chimiothérapie utilisée pour la lymphodéplétion, la structure du CAR (domaine de costimulation)). Ainsi l'utilisation des CAR-T cells en clinique sur une large population de patients permettra d'apporter des données plus représentatives que ceux obtenues sur des cohortes bien définies.

3.6 Effets secondaires des CAR-T cells anti-CD19 et leurs prises en charge

Les effets secondaires des cellules CAR-T anti-CD19 sont liés principalement à leur mécanisme d'action. Ils sont répartis en 2 catégories : Effets secondaires aigus et retardés

3.6.1 Effets secondaires aigus

- **Syndrome de relargage cytokinique**

Le syndrome de relargage cytokinique (SRC) est la complication la plus fréquente après traitement par CAR T-cells. Le délai médian de survenu est de 5 jours. Il s'agit d'une réaction inflammatoire systémique inappropriée, médiée par un taux très élevé de cytokines pro-

inflammatoires ainsi qu'une hyperactivation des cellules de l'immunité et des cellules endothéliales. Cet état pro-inflammatoire est la conséquence de l'activation des CAR T-cells après reconnaissance de l'antigène tumoral, entraînant la libération de nombreuses cytokines tels que l'IL-2, l'IL-6, IFN gamma, TNF alpha et de l'activation des cellules mononuclées et des cellules dendritiques libérant à leur tour de l'IL-1, IL-6, IL-10, IFN gamma (59). Sur le plan clinique, on retrouve de façon variable une fièvre élevée, une asthénie, des nausées, une tachycardie, une hypotension artérielle pouvant évoluer vers une défaillance multiviscérale mettant en jeu le pronostic vital du patient (56).

Le traitement repose sur l'administration d'anticorps bloquant l'IL-6 : le tocilizumab (ROACTERMA®) (60). Plusieurs études affirment que l'administration du tocilizumab ne diminue pas l'efficacité des CAR-T cells et n'augmente pas le risque des rechutes. Les corticoïdes sont réservés aux cas extrêmes d'échec du tocilizumab. Cependant, leur innocuité vis-à-vis des CAR-T cells demeure non prouvée (60).

Une classification en quatre grades de sévérité croissante basée sur des critères clinico-biologiques a été établie. Le premier grade correspond à une hyperthermie isolée et les grades suivants sont définis sur le caractère réfractaire de l'hypotension artérielle ainsi que l'atteinte multiviscérale. Plusieurs études ont mis en évidence la pertinence du dosage de l'IL-6 comme marqueur de SRC ainsi que sa corrélation avec la sévérité clinique (61).

Dans l'étude ELIANA, 77% des patients ont présenté un SRC dont 59% ont été admis en unité de réanimation pour une médiane de 8 jours et 39% ont reçu un traitement anti-IL6. Aucun patient de cette étude n'est décédé des suites du SRC (13) (41).

- **Syndrome d'activation macrophagique**

Des cas de syndrome d'activation macrophagique (SAM) ont été décrits chez environ 1 % des patients traité par CAR-T cells (61). En raison des ressemblances à la fois cliniques (fièvre, défaillance multi-viscérale, confusion, altération de l'état général...) et biologiques (hyperferritinémie, hyperlactatémie, hypofibrinogénémie, pancytopenie, défaillance hépatique, rénale...), il est souvent confondu avec le SRC. Le SAM est souvent défini comme un SRC d'évolution défavorable sous traitement par anti-IL-6 (61).

- **Neurotoxicité : ICANS (*Immune effector Cell-Associated Neurotoxicity Syndrome*)**

C'est le second effet indésirable le plus fréquemment observé, retrouvé dans environ 25 à 50% des cas (56). Sa survenue est plus tardive que le SRC auquel il succède souvent (62). Cette toxicité est en règle générale spontanément résolutive. Néanmoins, quelques cas d'œdèmes cérébraux d'évolution rapide et fatale ont été décrits et ont suspendu le développement de certains CAR-T cells (phase 2 de l'essai ROCKET) (63). La physiopathologie de cette toxicité est complexe et jusqu'à présent non totalement connue. Une activation de l'endothélium cérébral, une perméabilisation de la barrière hémato-méningée et une augmentation de cytokines pro-inflammatoires dans le LCR (IL-1, IL-6, TNF alpha) ont été observées. L'activation de l'endothélium s'accompagne d'une coagulopathie responsable d'un tableau proche du Purpura Thrombotique Thrombocytopénique PTT, avec diminution des taux de multimères du facteur Willebrand et la survenue de microthrombi (62). Cette toxicité est dans la majorité des cas spontanément résolutive ou pris en charge par le traitement spécifique du SRC associé à une corticothérapie. Une classification intégrant l'évolution cognitive, la pression intracrânienne et la présence de crises convulsives a également été proposée et permet d'estimer la sévérité de cette toxicité selon quatre grades.

3.6.2 Effets secondaires retardés

- **Aplasie B, hypogammaglobulinémie et complications infectieuses**

La lymphopénie B profonde est liée à l'effet « *on-target off-tumor* » des CAR-T anti-CD19 dont la cible antigénique est exprimée par les cellules blastiques mais également par les lymphocytes B normaux. Elle reflète la persistance *in vivo* des CAR-T cells qui sera déterminée principalement par la construction du CAR et son domaine de costimulation (4-1BB ou CD28). La majorité des patients reçoivent une supplémentation par des immunoglobulines intraveineuses (IgIV) et une prophylaxie anti-infectieuse (58).

- **Complication à long terme**

Dans le cadre de l'utilisation des CAR-T cells, la législation européenne demande le suivi des patients exposés aux traitements géniques pendant 15 ans, afin de détecter la survenue des complications tardives telles que des maladies auto-immunes, des troubles neurologiques tardifs, des hémopathies ou des néoplasies secondaires, ainsi que l'impact sur d'éventuelles grossesses et le risque de stérilité. Il faut noter qu'à ce jour, aucune néoplasie secondaire n'a été observée, y compris chez les patients avec une persistance *in vivo* prolongée des CAR-T cells (56).

3.7 Mécanismes d'échappement tumoral

Après traitement par CAR-T cells, le taux de rémission à 3 mois est de l'ordre de 80 à 90 %. Cependant, environ 40 % de ces patients vont rechuter dans les 12 mois suivant le traitement (16).

Le mécanisme d'échappement principalement observé est lié à la perte de l'expression de l'antigène CD19 par les cellules tumorales et représente aujourd'hui jusqu'à 60% des rechutes (64). Dans l'étude ELIANA, parmi les 22 patients en rechutes, 15 avaient perdu l'antigène cible (CD19). Cette perte d'expression peut être liée soit à une délétion totale du gène codant pour le marqueur CD19, soit à une mutation permettant aux cellules leucémiques d'exprimer une forme tronquée de CD19, ayant perdue le site de liaison au CAR (32). Le type de construction du CAR peut favoriser ce type de rechutes. Les CAR-T cells incluant le domaine de costimulation CD28, induisent des rechutes plus précoces mais sans perte de l'expression de CD19. Alors que, les cellules CAR-T avec le domaine de costimulation de type 4-1BB, provoquent des rechutes plus tardives avec perte ou mutation de l'antigène cible. La différence pourrait s'expliquer par une pression de sélection plus importante sur les cellules leucémiques exercées avec les CAR-T cells 4-1BB qui persistent plus longtemps et induisant l'échappement du clone CD19 négatif (implication du facteur temps) (65). La recherche de nouvelles cibles (CD22,CD20) et le développement de constructions bispécifiques du récepteur chimérique (CD19, CD22) pourraient limiter ce phénomène mais également représentent une alternative de prise en charge chez ces patients en rechute avec perte d'antigène cible (66) (67).

La deuxième principale cause de rechute est liée à la disparition précoce des CAR-T cells, entraînant des rechutes sans perte de l'antigène cible. Le choix du domaine de costimulation, le phénotype des cellules T obtenues au moment de l'aphérèse ainsi que le microenvironnement tumoral inhibiteur, sont des facteurs qui influencent la persistance des CAR-T cells *in vivo* et sont par conséquent impliqués dans les rechute précoces (32).

De rares cas de cellules leucémiques exprimant le CAR ont été décrits. Ce mécanisme a été observé pour la première fois chez un patient traité dans le cadre d'une LAL-B récidivante. Une expansion clonale d'une seule cellule leucémique dont le CD19 était masqué par la liaison d'un CAR exprimé par une autre cellule leucémique a engendré un échec thérapeutique et la mort de ce patient. Un tel masquage d'épitope a ensuite été modélisé *in vitro* avec des CAR-T anti-CD19 et anti-CD22 (68).

Plus récemment, un nouveau mécanisme de résistance a été identifié dans des études *in vitro*, par lequel les CAR-T cells pourraient capter le CD19 exprimé sur les cellules tumorales par un phénomène de trogocytose. Ceci entraînerait par conséquent, une destruction mutuelle des CAR-T cells responsable de leur disparition précoce (69).

DEUXIEME PARTIE : Suivi des CAR-T cells au laboratoire

1 Le devenir des CAR-T cells *in vivo*

La pharmacocinétique (étude du devenir d'un médicament dans l'organisme) est importante pour définir les modalités d'administration du médicament, à savoir la voie, la dose et le rythme des prises. Elle permet également de connaître l'influence potentielle des caractéristiques du sujet (âge, métabolisme, pathologies) ou des médicaments associés. Les agents pharmacologiques, les plus souvent utilisés en thérapeutique suivent un modèle pharmacocinétique, constitué par 4 étapes principales, l'**A**bsorption de la molécule, la **D**istribution dans l'organisme, l'**E**limination comprenant la biotransformation ou **M**étabolisme et l'**E**limination (ADME). Ce modèle simplifié, a permis de mettre en place des protocoles de suivi adaptés, par des dosages pharmacologiques de la plupart des molécules.

La cinétique des thérapies cellulaires est beaucoup plus complexe et ne suit pas le schéma classique. Ainsi, la caractérisation du profil cinétique des CAR-T cells est fondamentale pour comprendre les données cliniques d'efficacité et d'innocuité à l'appui de la dose recommandée.

Après une perfusion de Tisagenlecleucel (Kymriah®), une large distribution se produit dans l'organisme en quelques heures entraînant une diminution de sa concentration dans le sang périphérique. Cette étape dépend en grande partie de la capacité de diffusion et de migration du médicament, vers la moelle osseuse, le LCR et d'autres organes lymphoïdes secondaires, afin de rencontrer l'antigène cible. Le Tisagenlecleucel (Kymriah®) possède une bonne capacité de diffusion notamment dans le LCR ; une propriété recherchée dans les LAL-B en raison du risque de rechute méningée très fréquent. En effet, dans l'étude ELIANA le transgène codant pour le CAR anti-CD19 est détectable dans le LCR chez tous les patients en rémission à J28, M3 et M6 post infusion (56).

Au cours des deux semaines suivant la perfusion, on observe une croissance exponentielle des CAR-T cells au-delà de la dose cellulaire initialement administrée, correspondant à la phase d'expansion. Cette étape est indispensable afin d'obtenir un rapport de cellules effectrices/cellules cibles satisfaisant, représentant un facteur prédictif de la réponse initiale au traitement

(65). La liaison du Tisagenlecleucel (Kymriah®) à son antigène cible, le CD19, va permettre d'initier la cascade de signalisation, qui conduit à l'activation et l'expansion des CAR-T cells et à la sécrétion de cytokines et de chimiokines inflammatoires permettant de mobiliser le système immunitaire du patient afin de détruire les cellules cibles.

Une fois que le pic d'expansion (C_{max}) est atteint, cette étape est suivie d'une régression bi-exponentielle. La première phase correspond à une diminution rapide de la concentration des CAR-T cells, en raison de l'apoptose programmée de la plupart des lymphocytes activés à la suite de la réponse immunitaire et de la diminution de l'antigène cible. La seconde phase du déclin se produit plus progressivement et correspond à la persistance des CAR-T cells à long terme en raison du phénotype mémoire à longue durée de vie des cellules T ou d'une prolifération constante des CAR-T cells à faible niveau engendré par la production continue d'antigène cible (70).

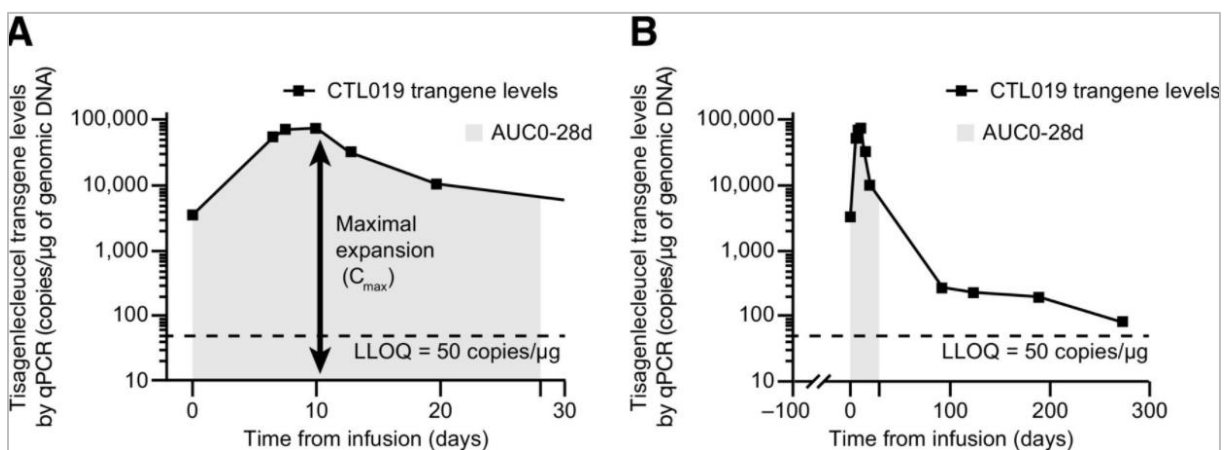


Figure 7: Cinétique du Tisagenlecleucel (Kymriah®) (70)

Le graphique représente le profil cinétique du Tisagenlecleucel (Kymriah®) d'un patient pédiatrique atteint de LAL-B, inclut dans l'étude ELIANA montrant la phase d'expansion initiale avec le pic d'expansion C_{max} (A) et la persistance au 300^{ème} jour (B). (LLOQ, limite inférieure de quantification).

Deux paramètres sont principalement utilisés pour décrire le profil cinétique des CAR-T cells :

- **L'expansion**

Elle reflète la capacité de prolifération des CAR-T cells *in vivo* après rencontre de l'antigène cible, permettant d'atteindre une concentration maximale (C_{max}) après 1 à 2 semaines suivant la perfusion (T_{max}). Cette étape est le point clé de l'efficacité anti-tumorale et semble être corrélée à l'efficacité du traitement dans les LAL-B de l'enfant (71).

L'aire sous la courbe (AUC) de 0 à 28 jours est un paramètre pertinent, utilisé pour comparer la capacité d'expansion *in vivo* entre les patients répondeurs et non répondeurs au traitement.

- **La persistance**

Elle indique la durée pendant laquelle les CAR-T cells sont détectables dans le sang périphérique. Dans la littérature, la persistance des CAR-T cells est considérée comme un facteur prédictif de rémission de longue durée dans les LAL-B pédiatriques. Elle peut être prédite par la durée d'aplasie des lymphocytes B (72). Cependant il a été démontré, qu'une persistance prolongée était également associée à une rechute avec perte d'expression de l'antigène cible CD19 sur les cellules blastiques (32).

2 Les outils du suivi des CAR-T cells au laboratoire

Les thérapies cellulaires à base de CAR-T cells sont passées du cadre des essais cliniques à une pratique de routine en oncohématologie. Le suivi de ces thérapeutiques est devenu crucial pour déterminer la persistance et la prolifération, deux mécanismes clés définissent l'efficacité anti-tumorale et la durée de la rémission. Outre le potentiel thérapeutique important, les CAR-T cells peuvent également induire des toxicités importantes, principalement par une libération massive de cytokines inflammatoires. Afin de mieux comprendre l'origine des effets secondaires, suivre l'expansion et la persistance *in vivo*, et élucider les mécanismes de non-réponse ou de rechute, différentes approches de suivi au laboratoire ont été développées :

- Dosage des cytokines inflammatoires (IL1, IL6, TNF alpha).
- Etude phénotypique et quantification des CAR-T cells par cytométrie en flux (CMF).
- Quantification et suivi du transgène par des techniques de biologies moléculaires : PCR quantitative (qPCR), Digital PCR (dPCR), Digital Droplet PCR (ddPCR).

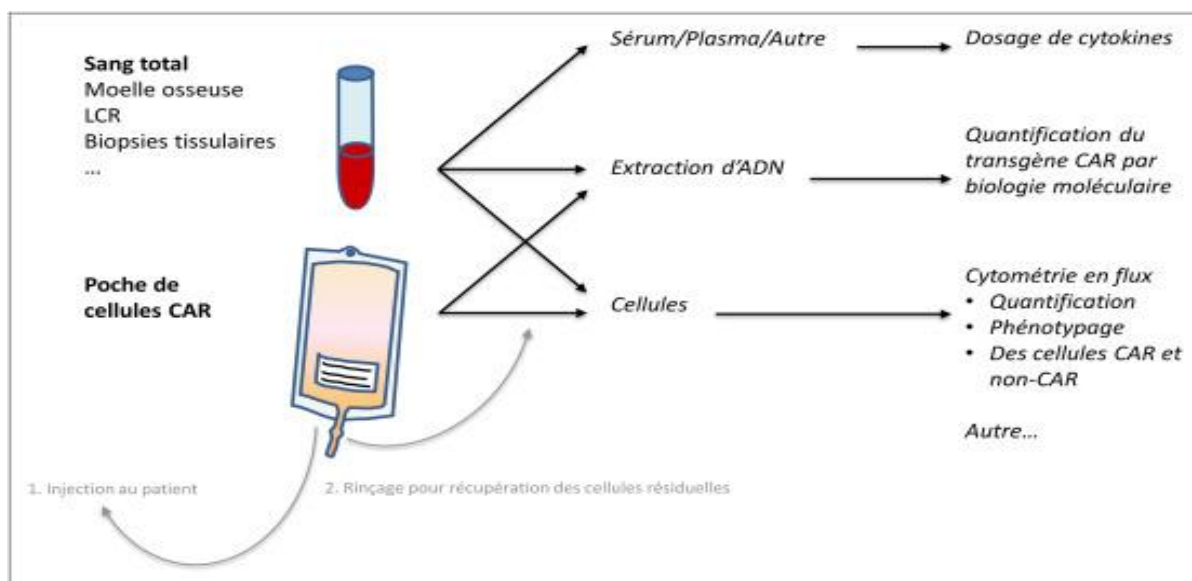


Figure 8: Différentes analyses réalisables en routine pour le suivi immunologique des traitements par CAR-T cells (73)

Les CAR-T cells peuvent être quantifiés dans le sang périphérique, la moelle osseuse et le LCR des patients, mais également dans le contenu de la poche de perfusion après rinçage pour analyser le phénotype et la viabilité des cellules injectées.

2.1 Dosage des cytokines et facteurs solubles :

L'exploration du profil de cytokines ou des facteurs solubles produits avant ou pendant le traitement par CAR-T cells présente un intérêt pour la prédiction de l'efficacité du traitement et surtout de ses effets secondaires. Actuellement, plusieurs études ont permis de démontrer la pertinence du dosage de l'IL-6 comme marqueur de SRC ainsi que sa corrélation avec la sévérité clinique. Ces données sont d'ailleurs à l'origine de l'utilisation du tocilizumab, anticorps anti-récepteurs membranaires et solubles de l'IL-6, aussi bien pour le traitement des patients présentant un SRC qu'une neurotoxicité (60).

Ces dosages se font sur sérum ou plasma avec comme prérequis un prélèvement décanté et congelé rapidement. Ils peuvent être réalisés par différentes techniques. Les plus fréquemment utilisées sont l'ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) ou la fluorimétrie en flux

(Luminex). Un nouveau système automatisé et miniaturisé d'ELISA micro-fluidique a été récemment développé et permet aujourd'hui le dosage simultané d'un large panel de cytokines et facteurs solubles avec une très bonne sensibilité (ELLA Simple Plex, Biotechne, USA) (74). La prise en charge par le tocilizumab tend à se généraliser et ce, dès les premiers signes de SRC. Il est important de noter qu'en fonction de la technique utilisée, l'injection de tocilizumab peut interférer avec les dosages d'IL-6 dont la concentration augmente après traitement par ce dernier. Ceci a été fréquemment observé avec la technique de dosage ELLA. Cette augmentation est probablement liée à un déplacement par compétition de l'IL-6 fixée à son récepteur par le tocilizumab (75).

2.2 Techniques de biologie moléculaire

Le séquençage complet de la séquence d'ADN codant pour le CAR a permis de développer des techniques de détection et de quantification des CAR-T cells par amplification en PCR de régions du CAR à partir de sondes spécifiques de ces régions (séquence du vecteur, fragment du CAR). Il est ainsi possible d'amplifier les séquences promotrices « *Long Terminal Repeat* » (LTR) du vecteur viral (rétrovirus ou lentivirus) utilisé pour la transduction du CAR (76). Cette méthode peut présenter le risque de croisement avec des séquences LTR résiduelles présentes dans le génome ou de ne pas reconnaître des séquences LTR modifiées pour empêcher l'autoréplication du virus (*Self-Inactivating Lentivirus Vector*, SIN-LTR) (76).

Une autre approche consiste à amplifier un fragment spécifique de la partie extracellulaire ScFv du CAR mais devra être réadaptée pour chaque nouveau récepteur (77). Alternativement, la PCR peut cibler les séquences de jonction avec les domaines de costimulation, CD28/CD3 dans le cas du Axicabtagene ciloleucel (Yescarta®) et 4-1BB/CD3 dans le cas du Tisagenlecleucel (Kymriah®) (78).

Les premiers protocoles de quantification des CAR-T cells ont été développés en PCR quantitative classique (qPCR). L'évolution des techniques de biologie moléculaire a, par la suite, conduit au développement de protocoles basés sur l'utilisation de la digitale PCR (dPCR). Cette nouvelle technique permet d'augmenter la sensibilité, la spécificité et la reproductibilité de la qPCR classique en créant des compartiments contenant chacun le mélange réactionnel et un nombre restreint de molécules d'ADN. En plus du gain en sensibilité, la dPCR permet une quantification absolue des acides nucléiques sans avoir recours à une gamme de référence.

Plus récemment, des techniques de quantification des CAR-T cells en utilisant la Digital Droplet PCR (ddPCR) ont été développées. Cette nouvelle technique dérivée de la dPCR utilise une émulsion d'eau et d'huile. L'échantillon initial est divisé en milliers de gouttelettes de cette émulsion et une amplification des acides nucléiques par PCR est réalisée dans chacune des gouttelettes. À l'image de la dPCR, le signal fluorescent de chaque réaction est ensuite mesuré et le nombre de copies est calculé selon le ratio de la distribution de la loi de Poisson ne nécessitant pas d'une gamme de référence (76).

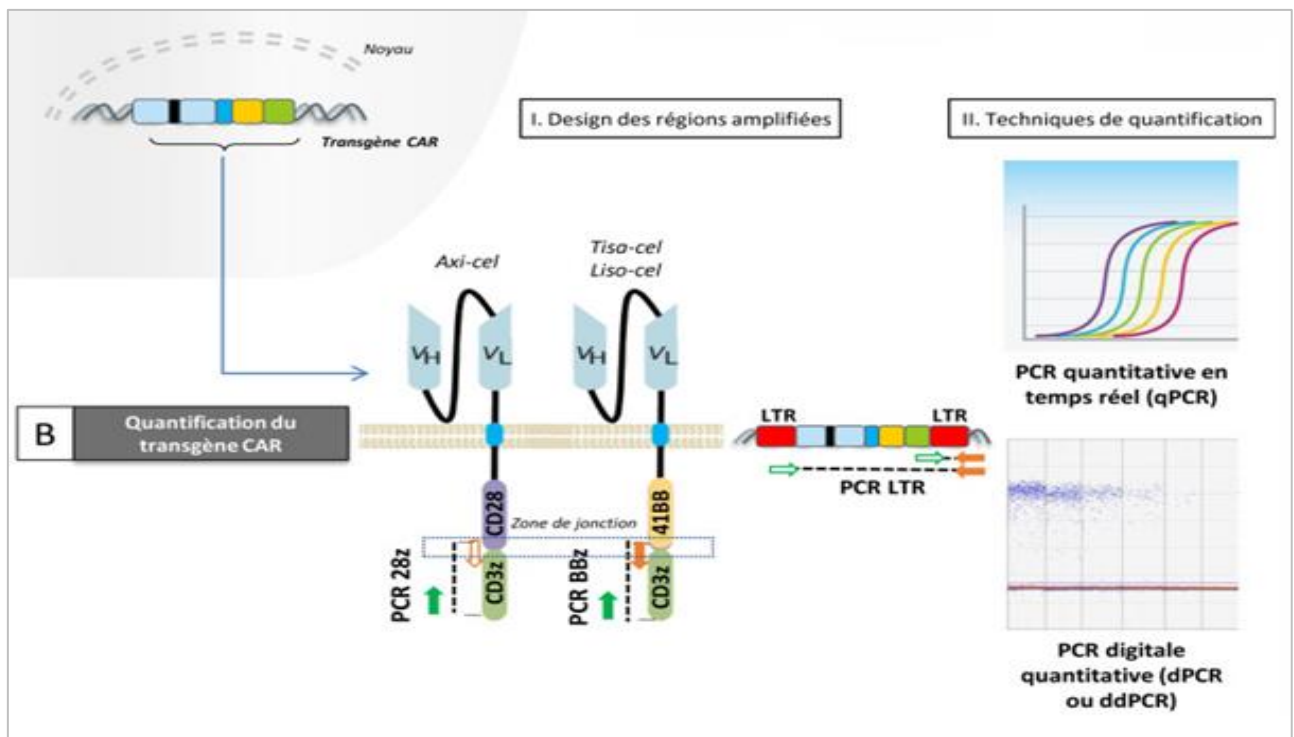


Figure 9: Principales techniques de détection des CAR-T cells par biologie moléculaire (73)

2.3 Suivi des CAR-T cells par cytométrie en flux

2.3.1 Principe

La cytométrie en flux a de multiples applications dans les thérapies cellulaires par CAR-T cells. Des protocoles de suivi et d'étude phénotypique ont été élaborés pour accompagner les différentes étapes du traitement, allant de l'aphérèse des lymphocytes T jusqu'au suivi *in vivo* des CAR-T cells réinjectés. Cette technique offre l'avantage de quantifier uniquement les CAR-

T cells exprimant à leur surface un CAR fonctionnel et d'analyser leur phénotype et l'expression des différents marqueurs membranaires.

La détection des CAR-T cells par cytométrie en flux repose sur l'utilisation d'anticorps reconnaissant directement le CAR (anticorps anti-idiotype ou anti-linker (79) (80)) ou de protéine recombinante soluble correspondant à la cible du CAR. A l'heure actuelle, la technique de choix utilisée dans le cadre d'un suivi en routine consiste à utiliser des protéines CD19 recombinantes. Ces réactifs se lient directement au site de liaison de l'antigène CD19 et permettent non seulement d'évaluer l'expression du CAR à la surface des cellules, mais également de confirmer que le CAR est capable de se lier à son antigène apparenté. La protéine CD19, le plus souvent de type CD19-Fc, est soit directement couplée à un fluorochrome (marquage en une seule étape) soit biotinylée. Dans ce dernier cas, le marquage est suivi d'une seconde étape faisant intervenir un anticorps anti-biotine couplé à un fluorochrome. Cette stratégie en deux étapes augmente la sensibilité du signal, et est donc conseillée pour détecter de faibles quantités de CAR-T cells circulants. Deux principaux réactifs sont commercialisés par deux fabricants différents ACROBiosystems et Miltenyi Biotec (81).

2.3.2 Les réactifs de détection

- **La protéine CD19 recombinante REAfinity™ de Miltenyi Biotec**

Ce réactif est constitué d'une protéine recombinante à base d'antigène biotinylé qui sera détecté par un anticorps anti-biotine marqué par un fluorochrome, la phycoerythrine (PE). Cette protéine est composée de domaines extracellulaires CD19 humains qui vont se lier au site de liaison antigénique du CAR anti-CD19 et d'une région Fc mutée issue d'une sous-classe d'IgG1 humaine.

Ce réactif est utilisé dans le protocole du suivi des CAR-T cells anti-CD19 au laboratoire d'hématologie au CHU de la Timone

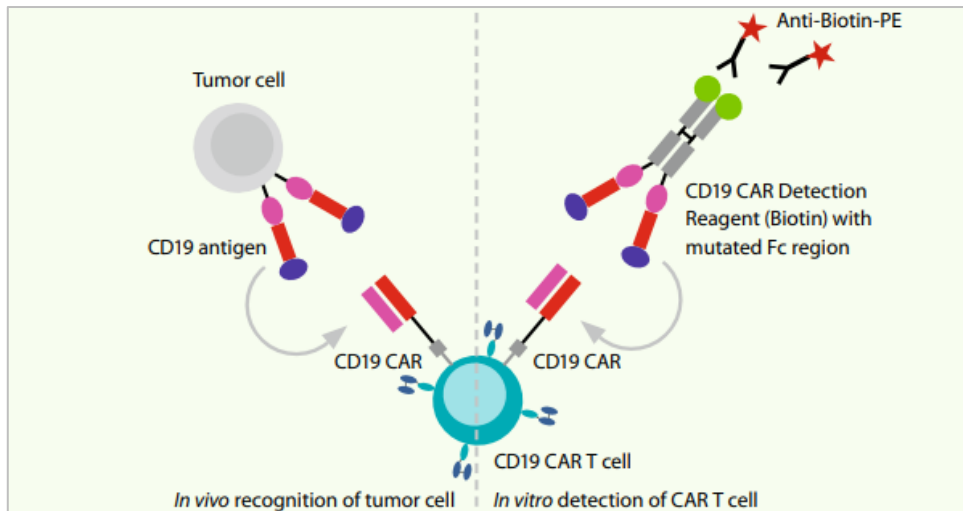


Figure 10: Stratégie de détection des CAR-T cells anti-CD19 avec le réactif Miltenyi Biotec

- **La protéine recombinante CD19 marquée ACROBiosystems**

Ce réactif est constitué d'une protéine CD19 recombinante directement marquée par un fluorochrome FITC (fluoresceine isothiocyanate), ne nécessitant pas d'étape de révélation secondaire après fixation au site de liaison antigénique du CAR (81).

Ces deux protéines recombinantes diffèrent par leurs fragments Fc (normal pour le réactif ACROBiosystems et muté pour le réactif Miltenyi Biotec). Cette différence est à l'origine du bruit de fond résiduel engendré par des liaisons aux récepteurs Fc sur des cellules non-T (NK, monocytes). Une saturation préalable des récepteurs Fc par un « Fc block » est nécessaire lors de l'utilisation du réactif ACROBiosystems.

- **Réactifs de détection universels (non commercialisé)**

La protéine L et les fragments Fab(ab')₂, ne sont pas spécifiques au site de liaison de l'antigène et peuvent être utilisés pour des CAR de conception et de spécificité antigénique différentes. Bien qu'ils soient moins coûteux, leur inconvénient majeur se manifeste par un bruit de fond très élevé. Ces réactifs sont utilisés uniquement dans le domaine de la recherche et ne sont pas commercialisés à l'heure actuelle.

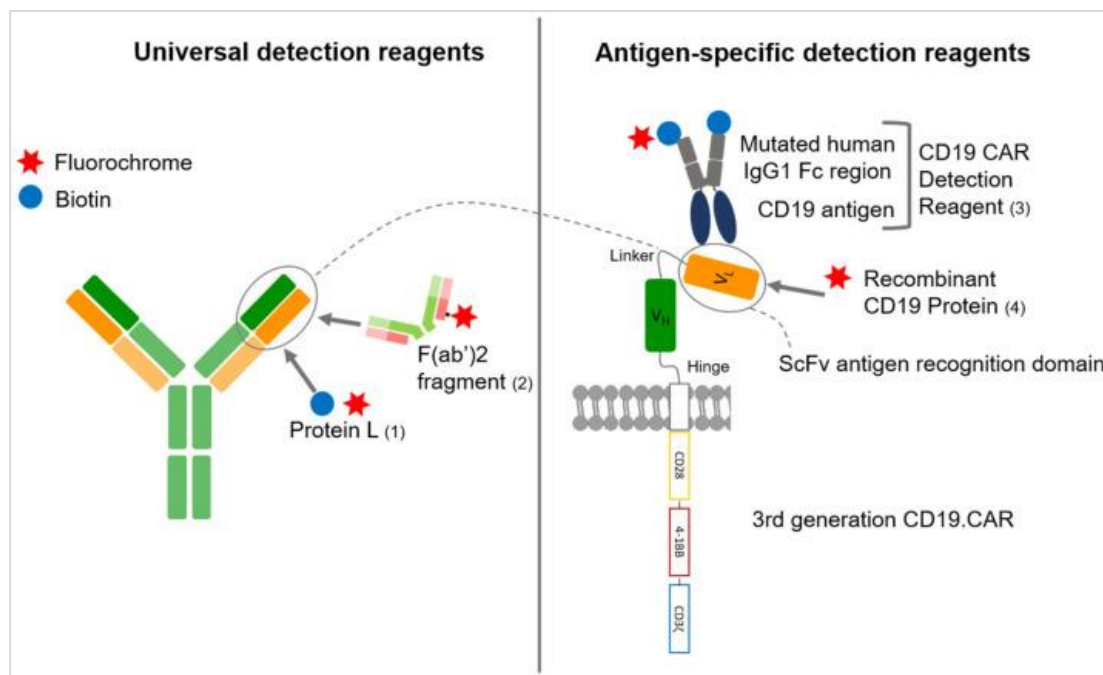


Figure 11: Les différents réactifs de détection des CAR-T cells anti-CD19 (81)

2.3.3 Sensibilité et spécificité des réactifs

Une étude récente réalisée par Schanda et al. a permis de comparer la sensibilité des différents réactifs à travers six dilutions successives d'échantillons de CAR-T cells dilués par du PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) (1, 1/5, 1/10, 1/50, 1/100, 1/1000). Les 4 réactifs avaient une même sensibilité de détection pour les 4 premières dilutions. Cependant, pour les dilutions élevées les réactifs F(ab')₂, la protéine L, la protéine CD19 de ACROBiosystem ont présenté une sensibilité de détection significativement inférieure par rapport à la protéine CD19 de Miltenyi Biotec (Schéma A) (81).

La même équipe a également étudié la spécificité de ces réactifs en utilisant 8 échantillons sanguins de donneurs sains qui ont été incubés avec les différents réactifs étudiés. Aucun faux positifs n'a été détecté avec le réactif de Miltenyi Biotec (Schéma B) (81).

Ainsi des différences importantes en termes de sensibilité et de spécificité en fonction du réactif utilisé sont à prendre en compte impérativement notamment lors de la comparaison des résultats réalisés par différents laboratoires. A l'heure actuel, la protéine CD19 recombinante de Miltenyi Biotec représente le meilleur réactif commercialisé en terme de sensibilité et de spécificité et qui est recommandé pour la détection des CAR-T cells par CMF (81).

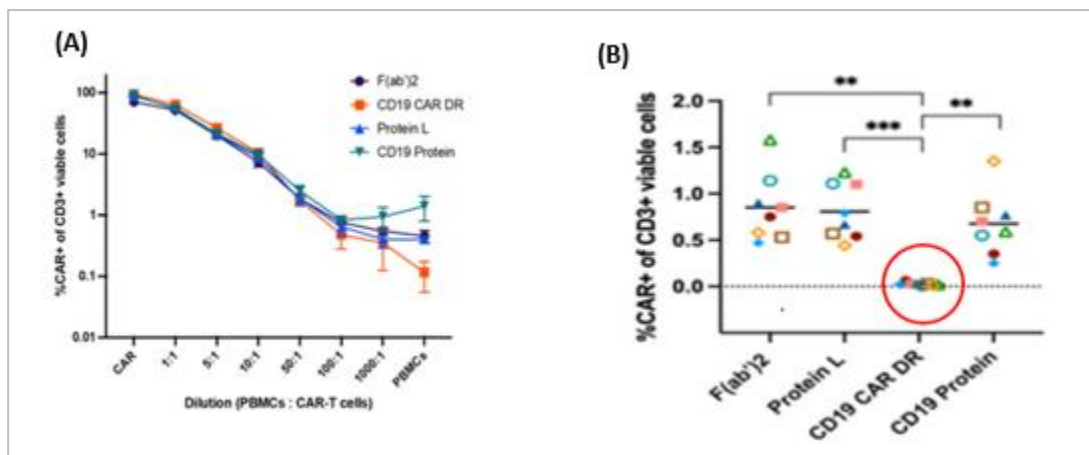


Figure 12: Eude de la sensibilité et de la spécificité des différents réactifs (81)

2.4 Recommandations du groupe CARTi et de la Société Francophone de Greffe de Moelle osseuse et de Thérapie Cellulaire (SFGM-TC)

L'expansion et la persistance sont deux entités qui conditionnent l'efficacité thérapeutique et la durée de la rémission des traitements par CAR-T cells. Le groupe national français du suivi des patients traités par des CAR-T cells (CARTi) et la Société Francophone de Greffe de Moelle osseuse et de Thérapie Cellulaire (SFGM-TC) ont travaillé sur le regroupement des différents résultats des patients traités par CAR-T cells afin d'établir des recommandations nationales. L'objectif de ce groupe de travail était d'harmoniser les différents outils du monitoring des CAR-T cells afin de pouvoir réaliser des études de corrélations clinico-biologiques multicentriques en dehors des essais cliniques. Ces données issues d'une large cohorte permettront à terme d'optimiser la prédiction et la prise en charge des complications sévères des traitements par CAR-T cells et d'identifier des facteurs de risque d'échec thérapeutique ou de rechute de la maladie. L'identification précoce des patients à haut risque d'échec permettra de proposer des thérapies alternatives aux CAR-T cells (73).

Analyses fortement recommandées

- Quantifications des CAR-T cells par CMF à J0 puis 2 à 3 fois par semaine jusqu'à J21 puis à M1, M2, M3, M6 puis tous les 6 mois jusqu'à la disparition du signal.
- Numération des LT (CD3/CD4), (CD3/CD8), LB et NK.

- Electrophorèse des protéines sériques à M1, M2, M3, M6 puis tous les six mois.

Analyses recommandées

- Phénotypage lymphocytaire du produit d'aphérèse (T/B/NK, CD3/CD4/CD8 ; sous-populations T naïves/mémoires).
- Phénotypage des CAR-T cells perfusés (poche de perfusion).
- Quantification des CAR-T cells dans le sang par PCR lorsque le signal CMF disparaît.
- Congélation de sérum pour dosage de cytokines ou facteurs solubles : en l'absence de biomarqueur consensuel des risques de SRC ou ICANS, il est recommandé de conserver le sérum à J0 puis à chaque point de suivi pour des études ultérieures.

Analyses complémentaires optionnelles

- Phénotypage élargi des cellules T à J0 puis 1 fois par semaine tant que le taux de CAR-T cells >1% : T naïfs/mémoires, marqueurs d'activation (CD25, HLA-DR) et d'épuisement (PD-1/Tim3/LAG3).
- Suivi de la reconstitution des populations immunes non-CAR (T, NK, monocytes...).
- Dosage de cytokines ou congélation de sérum aux points de suivi définis par les protocoles de recherche spécifiques des centres. Il est recommandé d'inclure les cytokines inflammatoires IL-6, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, CCL2, CCL3, IL-13, IL10 dont les taux ont été associés au SRC et à l'ICANS dans la littérature, ainsi qu'IL-7 et IL-15 qui sont associés à l'expansion des cellules CAR-T.
- Quantification des cellules CAR-T et phénotypage étendu dans d'autres prélèvements que le sang (LCR, MO, ganglion...) lorsqu'un prélèvement dans ces tissus est réalisé.

3 Expérience du laboratoire d'hématologie du CHU de Marseille

3.1 Objectifs

Depuis 2021, le laboratoire d'hématologie du CHU de la Timone à Marseille a mis en place un protocole de suivi des CAR-T cells ciblant l'antigène CD19 par cytométrie en flux.

L'objectif de ce travail a été d'analyser la cinétique des CAR-T cells par cytométrie en flux chez deux patientes pédiatriques atteintes de LAL-B, et d'étudier les différents facteurs ayant un impact sur l'expansion et la persistance des CAR-T cells, deux mécanismes qui conditionnent l'efficacité anti-tumorale et le développement des effets indésirables de ces thérapies innovantes.

3.2 Matériels et méthodes

3.2.1 Patientes

Nous avons travaillé à partir des données de deux patientes pédiatriques hospitalisées à l'AP-HM, dans le cadre de la prise en charge d'une LAL-B réfractaire ou en rechute, diagnostiquée respectivement en novembre 2013 et septembre 2018. Les informations clinico-biologiques ont été obtenues par l'examen des dossiers médicaux grâce au logiciel Axigate. Les patientes incluses étaient traitées par Tisagenlecleucel (Kymriah®), après plusieurs lignes de chimiothérapies. Une lymphodéplétion par fludarabine pendant 4 jours et cyclophosphamide pendant 2 jours, en commençant 5 jours avant la perfusion des CAR-T cells a été réalisée chez les deux patientes.

- **Patiente n°1 (sexe féminin, âge 10ans)**

En novembre 2013, une LAL-B au stade BII (commune) non hyperleucocytaire et sans atteinte méningée est diagnostiquée chez notre première patiente. Une hyperdiploïdie est observée au caryotype, associée à une absence de délétion IKAROS (IKZF1). Une prise en charge selon le groupe A du protocole FRALLE2000 est initiée permettant d'obtenir une bonne réponse au traitement avec une MRD indétectable à partir de J29 de la première intensification.

Cependant en octobre 2018, 23 mois après l'arrêt du traitement, une première rechute médullaire et méningée est survenue, retrouvant 73% de blastes au myélogramme (de même phénotype que celui observé initialement), associé à un envahissement méningé. Un traitement selon le protocole IntReALL SR (standard risque) bras A est entamé, permettant d'obtenir une MRD indétectable au seuil de 10^{-4} en fin de phase de consolidation. L'apparition d'une encéphalopathie mixte attribuée à la fois à la toxicité du traitement et à un choc septique à *Bacillus Cereus* ont entraîné le développement d'une épilepsie séquellaire symptomatique ayant nécessité la mise sous traitements antiépileptiques.

En février 2021, pendant la phase d'entretien du protocole en cours, une deuxième rechute retrouvant 92% de blastes au myélogramme est survenue. Un traitement à base de Tisagenlecleucel (Kymriah®), CAR-T cells de deuxième génération composé d'un domaine de costimulation de type 4-1BB, est alors décidé.

Une leucaphérèse est effectuée permettant d'obtenir un bon rendement cellulaire en cellules CD3+ ($6,6.10^9$ cellules CD3+). En attendant la production et la réinjection des CAR-T cells un traitement par vincristine et dexaméthasone et des injections intrathécales de méthotrexate, cytarabine et hydrocortisone sont débutés. Après la 2^{ème} injection de vincristine et la 3^{ème} injection intrathécale, 62% de blastes sont retrouvés au myélogramme et de rares lymphocytes matures dans le LCR (1 élément/mm³). Une chimiothérapie de lymphodéplétion par fludarabine et cyclophosphamide est réalisée 5 jours avant la réinjection des CAR-T cells. Enfin les CAR-T cells sont infusés environ un mois suivant l'aphérèse.

Compte tenu des antécédents neurologiques de cette patiente, une augmentation des posologies des traitements antiépileptiques est recommandée afin de limiter le développement de la neurotoxicité.

- **Patiente n°2 (sexe féminin, âge 5ans)**

En septembre 2018, cette patiente est diagnostiquée pour une LAL-B au stade BII (commune) non hyperleucocytaire et sans atteinte méningée. Une hyperdiploidie avec 55 chromosomes au caryotype associée à une absence de délétion *IKZF1* sont observées. Une prise en charge selon le protocole CAALL dans le groupe SR est initiée. Devant une réponse insuffisante en fin de phase de consolidation (MRD positive à $1,2 \times 10^{-4}$), le passage à un traitement plus intense (dans le groupe HR (high risque) du même protocole) est alors décidé, permettant d'obtenir une rémission complète avec une MRD indétectable un mois après.

En avril 2021, 6 mois après l'arrêt du traitement, une première rechute médullaire est observée, retrouvant 96% de blastes au myélogramme (blastes de même phénotype que ceux présents au diagnostic initial) et une absence d'envahissement méningé. Un traitement selon le groupe HR du protocole IntReALL est alors débuté. Cependant, une résistance au traitement est observée, marquée par la présence de 62% de blastes au myélogramme à J35 du début de l'induction. Un traitement à base de Tisagenlecleucel (Kymriah®), CAR-T cells de deuxième génération composé d'un domaine de costimulation de type 4-1BB, est donc décidé avec un projet d'allogreffe de CSH après obtention d'une rémission complète.

Une leucaphérèse permettant d'obtenir avec un bon rendement cellulaire en cellules CD3+ est réalisée. Ensuite un traitement par vincristine, cyclophosphamide et dexaméthasone est initié en attendant la production et la perfusion des CAR-T cells. Après deux injections de vincristine, 86% de blastes ont été retrouvés au myélogramme. Une chimiothérapie de lymphodéplétion par fludarabine et cyclophosphamide est réalisée 5 jours avant l'infusion des CAR-T cells. Enfin les CAR-T cells sont perfusés environ un mois et demi après l'aphérèse.

3.2.1 Protocole

3.2.1.1 Traitement des échantillons

Après réception au laboratoire d'hématologie de la Timone, le prélèvement sanguin ou médullaire doit être techniqué dans les 24 à 48h afin de limiter l'altération des cellules et ainsi obtenir une bonne sensibilité de détection.

Un volume total de 800 µL de sang périphérique ou de moelle osseuse est nécessaire pour la réalisation des 4 tubes présentés ci-dessous. Une première étape de lavage en utilisant 3 mL de PBS (phosphate-buffered saline) est réalisée, suivie par une étape de centrifugation à 350G pendant 5min. Après retrait du surnageant permettant de garder environ 100 µL d'échantillon dans chaque tube, vient l'étape de marquage en ajoutant 1 µL de la protéine recombinante CD19 FcBiot commercialisée par le laboratoire Miltenyi Biotec, uniquement dans le tube n°4.

Après incubation pendant 15min à température ambiante et à l'obscurité, un deuxième lavage en PBS est réalisé, suivi de l'étape de marquage par le panel d'anticorps préalablement défini (tableau n°3).

3.2.1.2 Marquage et panels utilisés

L'expression antigénique est analysée en utilisant des combinaisons d'AC couplés à divers fluorochromes : CD3 Pacific Blue (PB), CD45 Krome Orange (KrO), CD4 fluoresceine isothiocyanate (FITC), CD19 phycoerythrine cyanine 7 (PC7), CD8 allophycocyanine (APC), CD16 et CD56 phycoerythrine (PE), 7-AAD peridine chlorophylle proteine cyanine 5 (PC5.5), fournis par les laboratoires BC (Beckman-Coulter) et BD (Becton Dickinson) à l'exception de la protéine CD19 recombinante Fc couplée à la biotine et l'anticorps anti-biotine marqué qui sont fournis par le laboratoire Miltenyi Biotec.

Les différents anticorps nécessaires à la détection de la population CAR-T cells sont répartis dans les 4 tubes. L'anticorps anti-biotine est rajouté dans le tube n°1 et n°4 (tableau n°3).

	PB	Kro	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	AAF750
Tube 1	CD3	CD45		+Biot					
Tube 2	CD3	CD45	CD4					CD8	
Tube 3	CD3	CD45	CD4	CD16 CD56			CD19	CD8	
Tube 4	CD3	CD45	CD4	CD19 Fc +Biot				CD8	

Tableau 3: Panel d'anticorps utilisés pour la détection des CAR-T cells anti-CD19 sur sang total ou moelle osseuse

Tube 1 : L'ajout de l'anticorps anti-biotine sans la protéine CD19 recombinante FcBiot permet d'établir un seuil de détection positive et de s'affranchir du bruit de fond généré par l'autofluorescence cellulaire et les détections non spécifiques de l'anticorps utilisé. C'est le témoin négatif.

Tubes 2 et 3 : Ils permettent de déterminer les différentes populations lymphocytaires, LT (CD3+), LB (CD19+ CD3-), NK (CD3-, CD16+, CD56+) et la répartition des lymphocytes T CD4+ et CD8+

Tube 4 : La protéine CD19 recombinante Fc couplée à la biotine se lie au site de liaison antigénique du récepteur CAR anti-CD19 et sera par la suite révélée par l'anticorps anti-biotine

marqué, permettant ainsi de quantifier la population des CAR-T cells anti-CD19 et la répartition CD4/CD8 au sein de cette population.

Après l'étape de marquage, les tubes sont incubés pendant 15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière puis une étape de lavage en PBS est effectuée. Une dernière étape de lyse des globules rouges en utilisant une solution de NH₄CL (pH=7,4) préparée extemporanément au laboratoire d'hématologie, est réalisée avant le passage au cytomètre. Toutes les acquisitions sont réalisées grâce à un cytomètre Navios (Beckman-Coulter) et les analyses et interprétations sont effectuées avec le logiciel Kaluza® (Beckman-Coulter) en utilisant le module 'WL CART PC5.5' dans l'onglet MRD/autre diagnostic.

La quantification des CAR-T cells anti-CD19 sur un prélèvement de LCR ou sur le contenu de la poche de perfusion peut être réalisée avec le même protocole mais en utilisant uniquement 2 tubes contenant 200 µL d'échantillon chacun et un panel de marquage défini en fonction du prélèvement (tableaux n°4 et 5). Afin d'exclure les débris cellulaires et les cellules en apoptose, un marqueur de viabilité cellulaire, le 7-AAD (BioLegend), est obligatoire sur ce type de prélèvements fragiles.

	PB	Kro	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	AAF750
Tube 1	CD3	CD45							
Tube 2	CD3	CD45	CD4	CD19 Fc Biot		7AAD		CD8	

Tableau 4 : Panel d'anticorps utilisés pour la détection des CAR-T cells anti-CD19 sur la poche de perfusion

	PB	Kro	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	AAF750
Tube 1	CD3	CD45							
Tube 2	CD3	CD45	CD4	CD19 Fc Biot	CD16C D56	7AAD	CD25	CD8	CD20

Tableau 5: Panel d'anticorps utilisés pour la détection des CAR-T cells anti-CD19 sur LCR

3.2.2 Stratégie de fenêtrage

A partir de l'analyse du cytogramme (FS/SS), les fragments et débris cellulaires (FS faible) sont exclus pour ne garder que les cellules vivantes (Cells). Par la suite, sur le graphe CD45/SS les leucocytes sont sélectionnés grâce au marqueur pan leucocytaire CD45 après élimination des globules rouges et des débris restants (CD45 négatifs).

La stratégie de sélection commence par l'identification des différentes populations en fonction de l'expression du CD45 et des propriétés de structure (SS). Les lymphocytes sont CD45 positifs avec une structure non complexe, comparés aux granuleux qui sont CD45 positifs avec un SS variable traduisant leur hétérogénéité de structure.

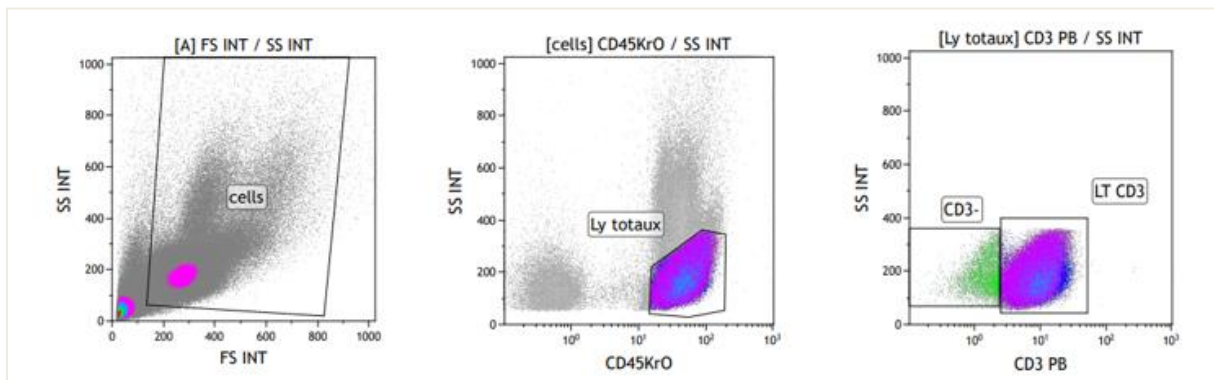


Figure 13: Sélection des différentes populations, exemple de la patiente n°2

Grâce à la taille (FS), à la structure (SC), à l'expression du CD45 et du CD3, les lymphocytes T (bleu-violet) sont sélectionnés.

Parmi les lymphocytes totaux (Ly totaux), les différentes populations lymphocytaires vont être identifiées en fonction des marqueurs exprimés : LB (CD3-, CD19+), LT (CD3+, CD19-), NK (CD3-, CD16+, CD56+), NKT (CD3+, CD16+, CD56+).

Les CAR-T cells anti-CD19 sont identifiés comme la population exprimant à la fois le marqueur CD3 et la protéine CD19 recombinante FcBiot, révélée par l'anticorps anti-biotine marqué. La répartition des CAR-T cells CD4+ et CD8+ sera évaluée sur le graphique CD4/CD8.

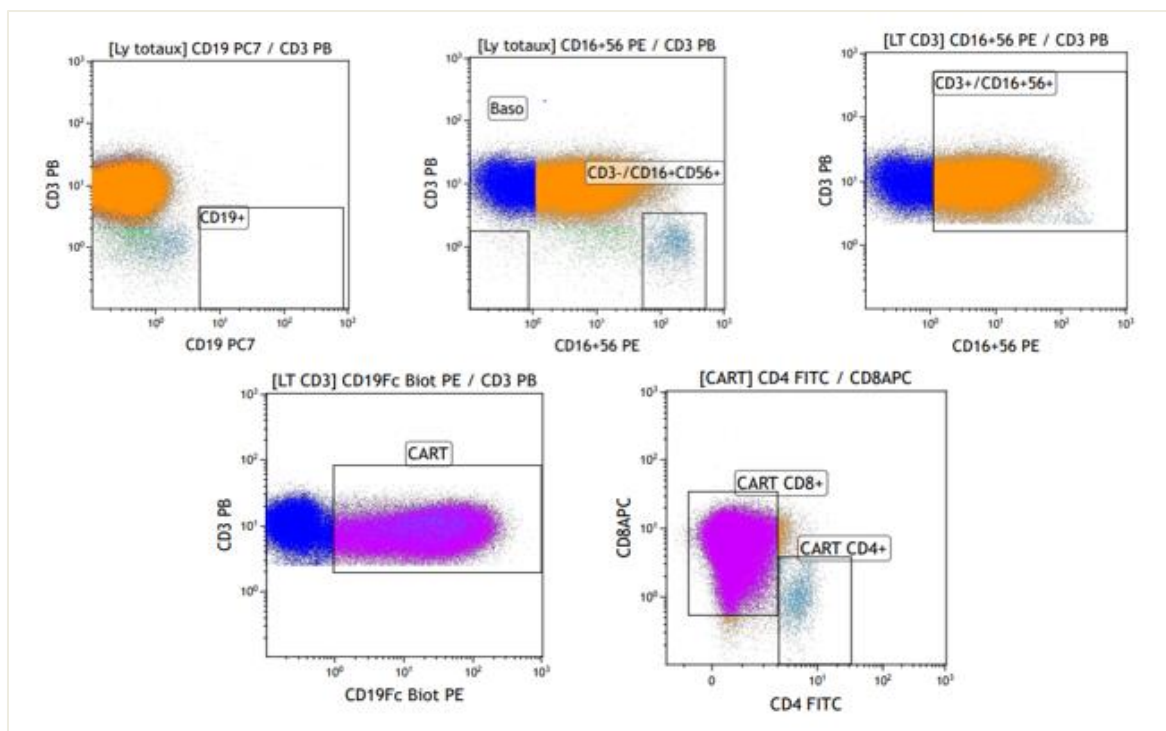


Figure 14: Sélection des différentes populations, exemple de la patiente n°2

Grâce à l'expression des marqueurs CD19, CD16, CD56, CD3, CD19 Fc biot, CD4 et CD8, les lymphocytes B, les NK (gris), les NKT (orange), les CAR-T cells anti-CD19(violet) sont identifiés, ainsi que la répartition CD4/CD8 au sein de la population des CAR-T cells

3.3 Résultats

3.3.1 Caractéristiques des patientes

Deux patientes pédiatriques âgées de 5 et 10 ans ont reçu du Kymriah® (CAR-T cells de deuxième génération composé d'un domaine de costimulation de type 4-1BB) dans le cadre du traitement d'une LAL-B au stade BII en 2^{ème} rechute (patient n°1) ou réfractaire au traitement (patient n°2).

Un suivi longitudinal de l'évolution du taux des CAR-T cells et des différentes populations lymphocytaires (LT, LB, NK) a été effectué par cytométrie en flux pendant trois mois suivant la perfusion des CAR-T cells.

10 prélèvements de sang périphérique ont été analysés chez chaque patiente :

- Patiente n°1 : à J5, J10, J12, J17, J20, J25, J31, J50, J60, J74 post réinjection.
- Patiente n°2 : à J3, J6, J8, J10, J14, J21, J36, J44, J58, J72 post réinjection

Chez la patiente n°1, la quantification des CAR-T cells a également été réalisée sur un prélèvement de LCR à J8 et sur des prélèvements de MO à J24 et J91 post infusion.

Tableau 6 : Détection des CAR-T cells par cytométrie en flux sur prélèvements de MO chez la patiente n°1 à J24, J91

	J24	J91
Lymphocytes totaux (%)	2	25
Lymphocytes CD3+ (%)	85	65
Lymphocytes CD3+ CD8+ (%)	45	48
Lymphocytes CD3+ CD4+ (%)	33	44
Lymphocytes CD3+CD16+CD56+(%)	20	22
Lymphocytes CD3-CD16+CD56+ (%)	12	17
Cellules CD19+ (%)	<0,1	13
CAR-T cells (%)	20	<0,5
CAR-T cells CD4+ (%)	10	
CAR-T cells CD8+ (%)	85	

Tableau 7: Détection des CAR-T cells par cytométrie en flux sur prélèvement de LCR chez la patiente n°2 à J6

J6	
Eléments/ mm3	46
Globules rouges/mm3	3
Formule leucocytaire	100% de lymphocytes
Lymphocytes CD3+ (%)	100
Lymphocytes CD3+CD4+ (%)	61
Lymphocytes CD3+CD8+ (%)	34
CAR-T cells (%)	85

Tableau 8: Suivi des CAR-T cells par cytométrie en flux sur des prélèvements de sang périphérique chez la patiente n°1

Jours post réinjection des CAR-T cells	07/04/2021 J5	12/04/2021 J10	14/04/2021 J12	19/04/2021 J17	22/04/2021 J20	28/04/2021 J25	04/05/2021 J31	21/05/2021 J50	04/06/2021 J60	18/06/2021 J74
Nature du prélèvement	Sang total	Sang total	Sang total	Sang total	Sang total	Sang total	Sang total	Sang total	Sang total	Sang total
Globules blancs (G/L)	0,18	0,75	0,74	0,68	0,73	1,5	2,3	3	3	4,4
Lymphocytes totaux (G/L)	0,18	0,71	0,55	0,36	0,38	0,36	0,66	0,63	0,63	0,67
Lymphocytes CD3+ (LT) (%)	99	99	98	98	90	80	65	70	63	58
Lymphocytes CD3+ CD4+ (%)	45	26	25	42	46	42	46	35	35	40
Lymphocytes CD3+ CD8+ (%)	40	39	68	43	49	48	46	26	30	54
Lymphocytes CD3+CD16+CD56+ (%)	31	48	37	25	18,5	19	15	6	6	9
Lymphocytes CD3-CD16+CD56+ (%)	2	1	2	2	5,7	14	24	25	23	30
CAR-T cells (%)	26	57	52	31	23	18	10	3	1,6	0,5
CAR-T cells CD4+(%)	30	5	5	5	4	5	5	10	9	25
CAR-T cells CD8+(%)	58	92	92	92	93	90	89	70	50	40
Lymphocytes B CD19+ (%)	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

Tableau 9: Suivi des CAR-T cells par cytométrie en flux sur des prélèvements de sang périphérique chez la patiente n°2

Jours post réinjection des CAR-T cells	23/07/2021 J3	26/07/2021 J6	28/07/2021 J8	30/07/2021 J10	03/08/2021 14	10/08/2021 J21	25/08/2021 J36	02/09/2021 J44	17/09/2021 J58	01/10/2021 J72
Nature du prélèvement	Sang total	Sang total	Sang total	Sang total	Sang total	Sang total	Sang total	Sang total	Sang total	Sang total
Globules blancs (G/L)	0,09	0,19	5,3	1,9	1,4	1,5	2,7	2,7	2,5	2
Lymphocytes totaux (G/L)	Non rendu	0,19	5,1	1,7	1	1,1	1,8	1,7	1,6	0,7
Lymphocytes CD3+ (LT) (%)	Non rendu	98	99	99	98	98	98	95	94	95
Lymphocytes CD3+ CD4+ (%)	Non rendu	17	4	8	21	17	12	8	12	85
Lymphocytes CD3+ CD8+ (%)	Non rendu	71	94	68	78	67	86	89	85	13
Lymphocytes CD3+CD16+CD56+ (%)	Non rendu	69	80	64	60	40	64	66	60	66
Lymphocytes CD3-CD16+CD56+ (%)	Non rendu	2	1	1	1	4	2	5	3,2	4
CAR-T cells (%)	Non rendu	36	71	37	22	8	3	1,8	1,4	1,2
CAR-T cells CD4+(%)	Non rendu	15	1	2	5	-	11	9	5	9
CAR-T cells CD8+(%)	Non rendu	80	97	88	95	-	79	83	65	77
Lymphocytes B CD19+ (%)	Non rendu	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

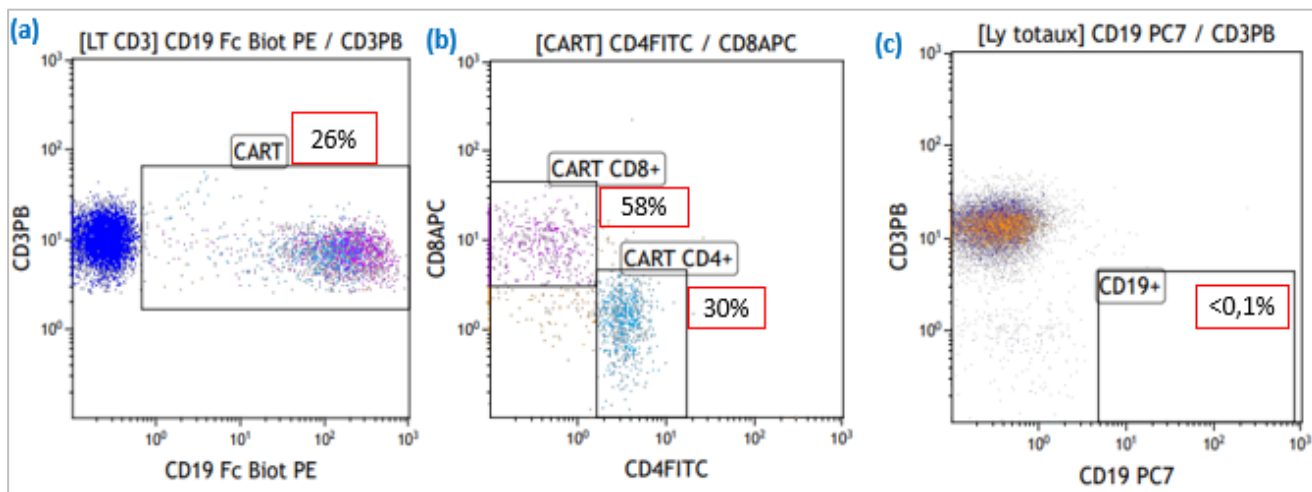
- **Patiente n°1**

Chez la patiente n°1, les CAR-T cells ont été détectés dans le sang périphérique 5 jours après l'infusion. Durant les 10 premiers jours, ces cellules ont proliféré pour atteindre un pic d'expansion à J10, suivi d'une phase de régression jusqu'au dernier prélèvement réalisé à J74, correspondant à la dernière détection des CAR-T cells dans le sang. Une aplasie de la lignée B a été observée tout au long de la persistance des CAR-T cells.

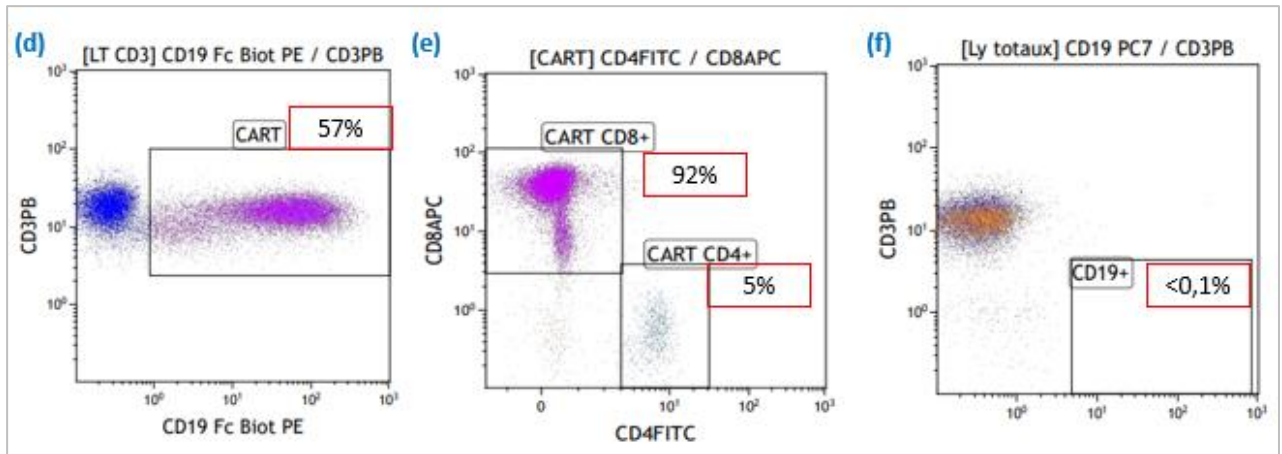
Au niveau de la répartition des CAR-T cells CD4+/CD8+, on note une prédominance des CAR-T cells cytotoxiques (CD8+) tout au long du suivi. Cette prédominance était discrète à J5 avec 58% de CAR-T cells CD8+ et 30% de CAR-T cells CD4+ puis majeure à J10 avec plus de 92% de CAR-T cells CD8+.

L'analyse du prélèvement médullaire à J91 a mis en évidence une disparition des CAR-T cells associée à une récupération de la lymphopoïèse B.

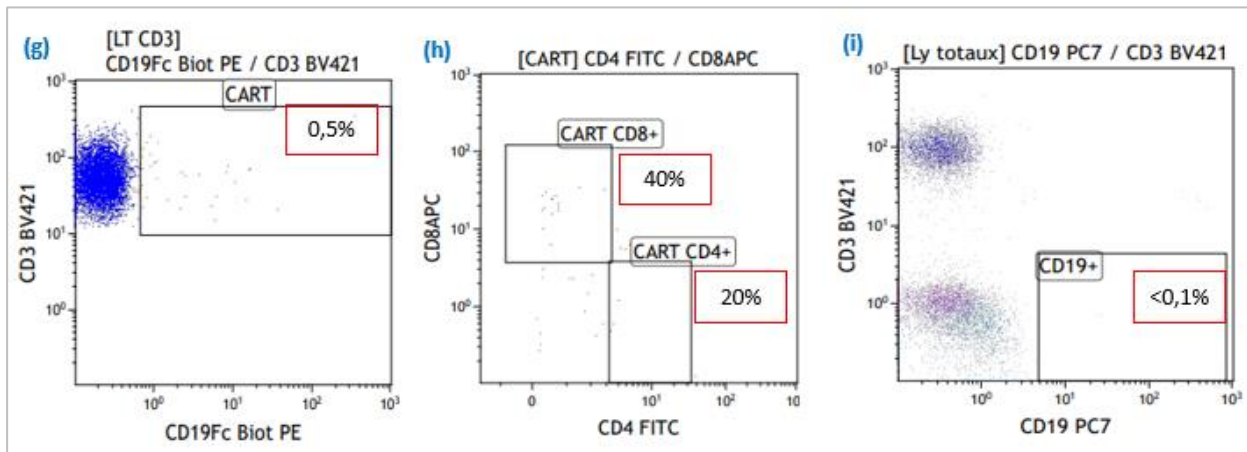
Jour 5 : Sang périphérique



Jour 10 : Sang périphérique

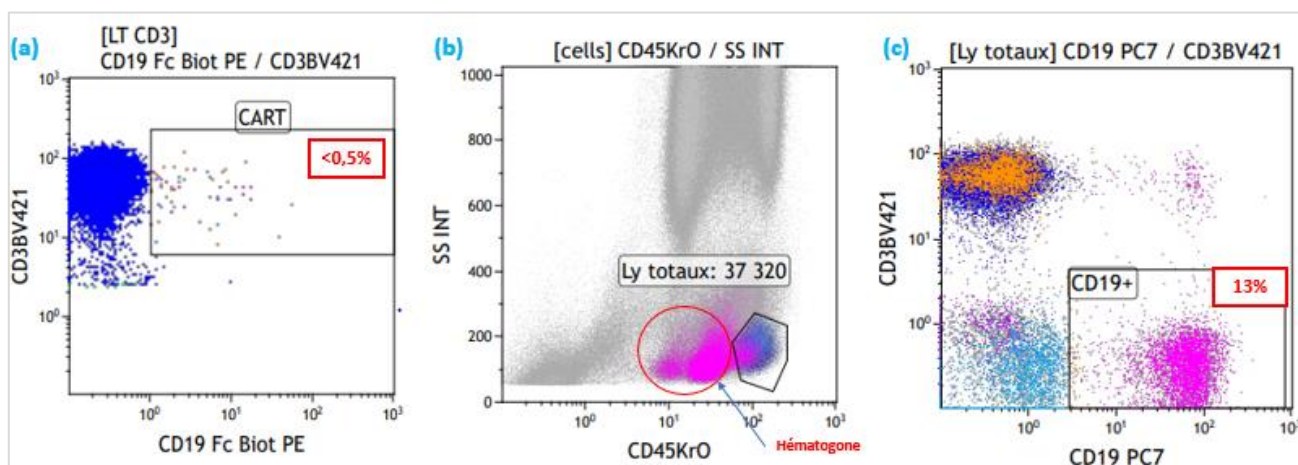


Jour 74 : Sang périphérique



Suivi longitudinal des CAR-T cells par cytométrie en flux à trois temps différents chez la patiente n°1 : J5 première détection des CAR-T cells dans le sang, J10 correspondant au pic d'expansion, J74 correspondant à la dernière détection des CAR-T cells circulants. Les graphes de gauches (a,d,g) permettent d'identifier la population des CAR-T cells, lymphocytes T exprimant à la fois le CD3+ et la protéine CD19 recombinante. Les graphes du milieu (b,e,h) permettent d'évaluer la répartition des CAR-T cells CD4+/CD8+ . Les graphes de droites (c, f,i) mettent en évidence l'aplasie de la lignée B tout au long de la persistance des CAR-T cells.

Jour 91 : Moelle osseuse



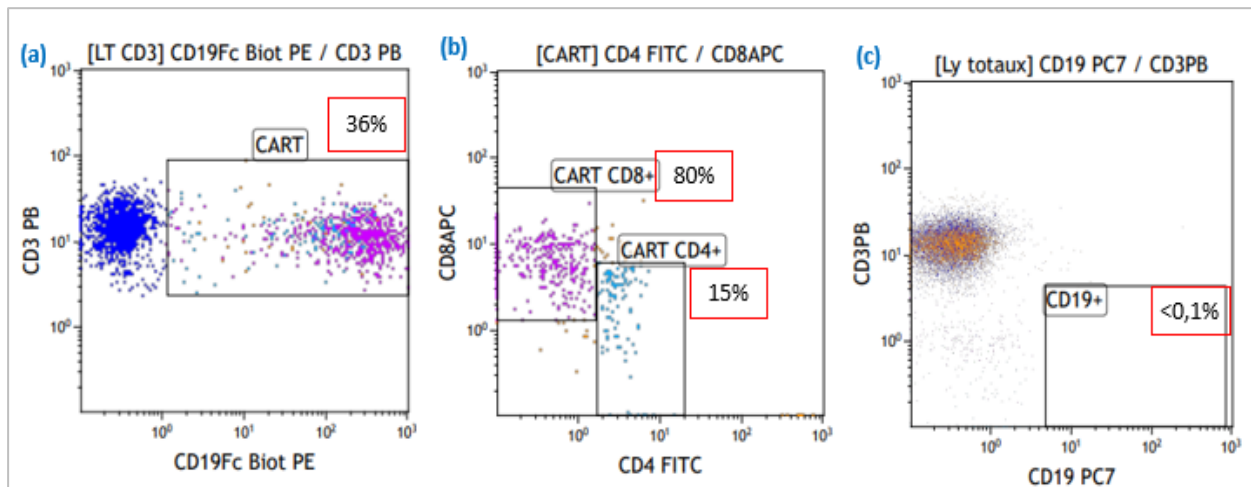
On observe une récupération de la lymphopoïèse B avec présence de précurseurs médullaires des cellules lymphoïdes B (CD19+) : les hémotogones représentant 12%, et de 1% de lymphocytes B (CD19+) matures. Cette perte d'aplasie de la lignée B est la preuve de la disparition des CAR- T cells fonctionnels chez cette patiente.

- **Patiente n°2**

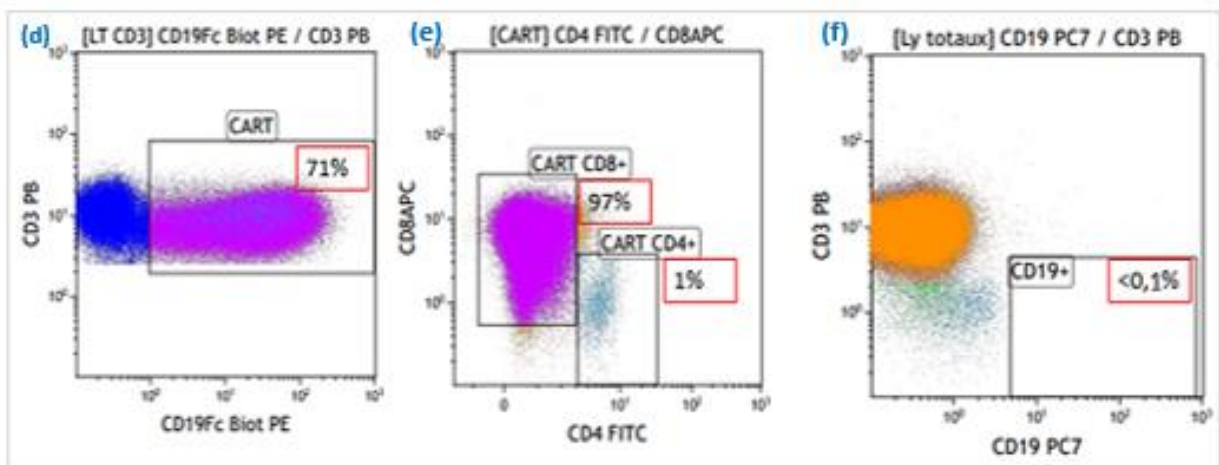
Chez la patiente n°2, le premier prélèvement sanguin réalisé à J3 n'a pas pu être analysé à cause d'une profonde leucopénie (taux des globules blancs=0,09G/L). Les CAR-T cells ont été détectés au bout de 6 jours suivant la perfusion. Le pic d'expansion maximal a été atteint à J8, suivi d'une phase de régression jusqu'au dernier prélèvement réalisé à J72. Une aplasie de la lignée B a été observée tout au long du suivi, témoignant de la persistance des CAR-T cells.

Au niveau de la répartition des CAR-T cells CD4+/CD8+, on note une prédominance majeure des cellules cytotoxiques (CD8+) représentant plus de 70% des CAR-T cells tout au long du suivi.

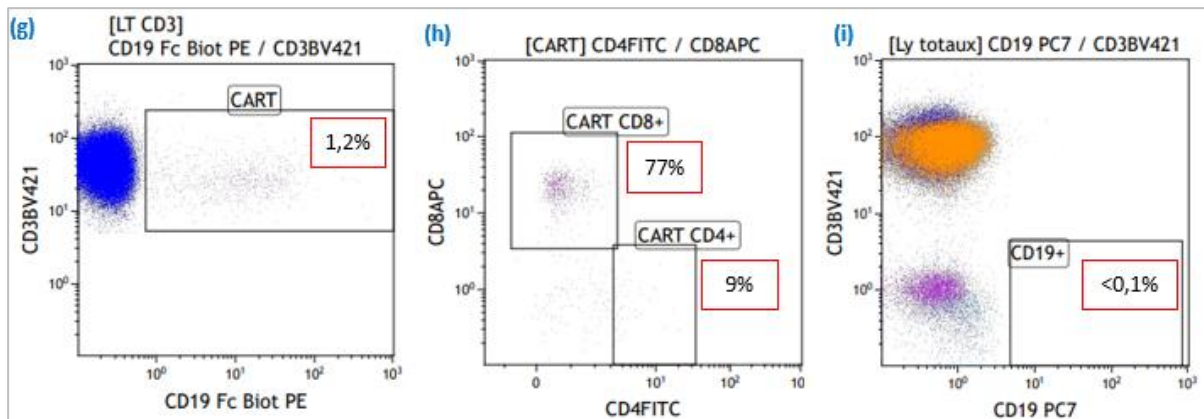
Jour 6 : Sang périphérique



Jour 8 : Sang périphérique



Jour 72 : Sang périphérique



Suivi longitudinal des CAR-T cells par cytométrie en flux à trois temps différents chez la patiente n°2 : J6 première détection des CAR-T cells dans le sang, J8 correspondant au pic d'expansion, J72 correspondant à la dernière détection des CAR-T cells circulants. Les graphes de gauches (a,d,g) permettent d'identifier la population des CAR-T cells, lymphocytes T exprimant à la fois le CD3+ et la protéine CD19 recombinante. Les graphes du milieu (b,e,h) permettent d'évaluer la répartition des CAR-T cells CD4+/CD8+. Les graphes de droites (c,f,i) mettent en évidence l'aplasie de la lignée B tout au long de la persistance des CAR-T cells.

3.3.2 Comparaison de la cinétique des CAR-T cells chez les deux patientes

Dans notre laboratoire, les résultats de la quantification des CAR-T cells par cytométrie en flux sont rendus en pourcentage de CAR-T cells pour 100 lymphocytes T. En analysant ces données on observe qu'après perfusion, les CAR-T cells ont proliféré chez les deux patientes durant les dix premiers jours. Le pic d'expansion a été atteint plus rapidement chez la patiente n°2, suivi d'une phase de régression plus rapide comparé à la patiente n°1, pour atteindre par la suite un plateau à partir de J35 chez les deux patientes.

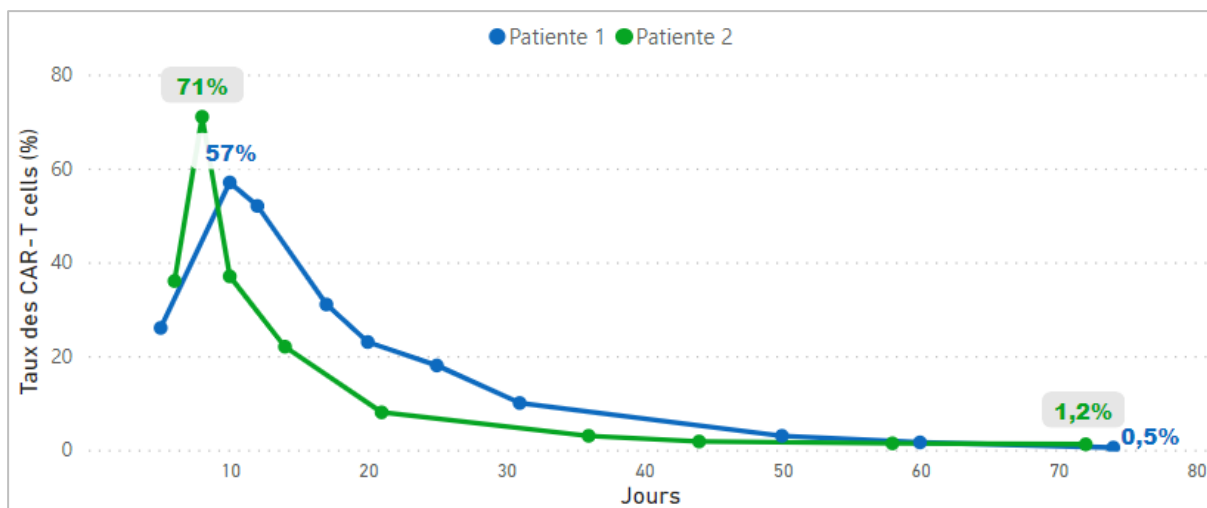


Figure 15: Comparaison du profil cinétique des CAR-T cells en pourcentage

Cependant, pour une meilleure appréciation de la capacité de prolifération des CAR-T cells *in vivo*, les taux en valeurs absolues sont plus fréquemment utilisés dans la littérature. Ainsi, dans notre étude les valeurs absolues des CAR-T cells (éléments/mm³) ont été recalculés manuellement sur la base des données du taux des lymphocytes totaux obtenus à chaque prélèvement. Grace à l'analyse de ces valeurs absolues nous observons une franche expansion des CAR-T cells chez la patiente n°2 avec un taux au pic atteignant 3580 cellules CAR-T/mm³ comparé à la patiente n°1 chez qui le taux au pic a atteint seulement 401 cellules CAR-T/mm³.

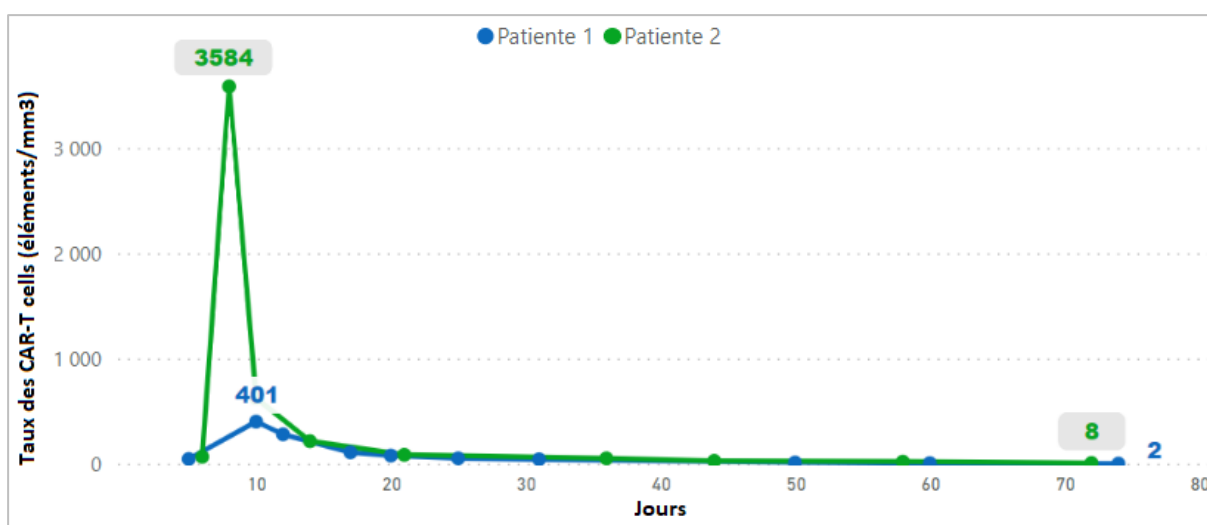


Figure 16: Comparaison du profil cinétique des CAR-T cells en valeurs absolues

Une rémission cytologique complète au myélogramme (<5% de blastes au myélogramme) associé à une maladie résiduelle indétectable au seuil de 10^{-4} ont été observées chez les deux patientes un mois après la perfusion du Tisagenlecleucel (Kymriah®) et maintenues durant les deux mois suivants.

Chez la patiente n°1 une perte précoce d'aplasie de la lignée B témoignant de la disparition des CAR-T cells est survenue trois mois suivant la perfusion. Par conséquent, devant le risque élevé de rechute, une allogreffe de CSH a été réalisée chez cette patiente, 5 mois après le traitement par Tisagenlecleucel (Kymriah®) (à J163).

Des résultats différents ont été observés chez la deuxième patiente. Une expansion plus élevée associée à une persistance des CAR-T cells et de l'aplasie des lymphocytes B tout au long du suivi ont permis de maintenir la patiente en rémission jusqu'à la greffe. En effet, chez cette patiente les CAR-T cells ont été utilisés comme un *bridge* à la transplantation pour obtenir une rémission en vue d'une allogreffe de CSH ultérieure, réalisée 82 jours après le traitement par Tisagenlecleucel (Kymriah®).

3.3.3 Effets indésirables

La patiente n°1 a développé à J1 post infusion des CAR-T cells, un SRC de grade 2 ayant nécessité l'administration d'une dose d'anticorps anti-IL6, le Tocilizumab. A J4, une neurotoxicité de grade 3 est apparue ayant également nécessité l'administration de 2 doses de Tocilizumab et d'une corticothérapie par Solumédrol pendant 48h. L'analyse du LCR à J6 a permis de mettre en évidence une forte infiltration lymphocytaire de type CD3+ dont 85% des cellules étaient des CAR-T cells.

Une évolution clinique favorable avec une récupération complète de l'état neurologique et une sortie d'aplasie ont été observés chez cette patiente au bout de 17 jours.

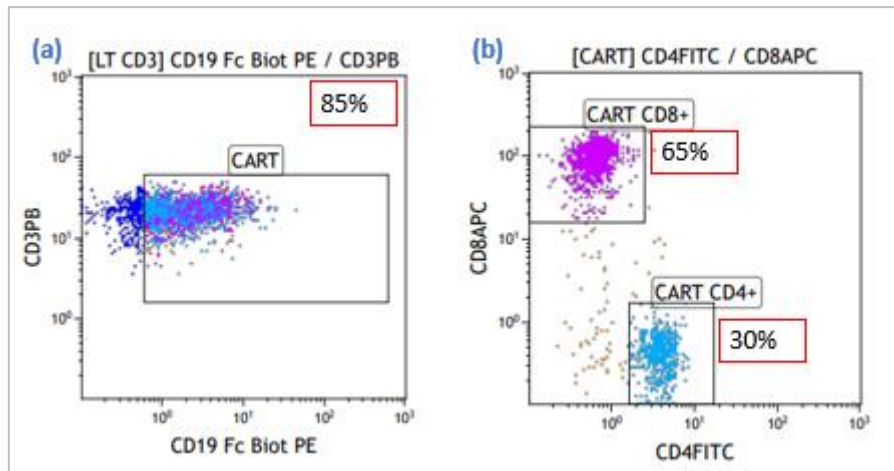


Figure 17: Détection des CAR-T cells dans le LCR chez la patiente n°1 à J6

La deuxième patiente a également développé des effets indésirables mais d'intensité et de gravité plus élevées. Un SRC de grade 3-4 est apparu à J1 après perfusion du Tisagenlecleucel (Kymriah®) et a nécessité l'administration de trois doses de Tocilizumab. Une neurotoxicité de grade 2 est également apparue à J7, traitée par deux bolus de Solumédrol. Parallèlement, cette patiente a développé un syndrome d'activation macrophagique clinico-biologique associé à une CIVD biologique. La sévérité de ces effets secondaires a entraîné une défaillance multi-viscérale ayant nécessité un séjour en service de réanimation pendant 4 jours.

Une bonne évolution clinique après la prise en charge optimale des effets indésirables ainsi qu'une sortie d'aplasie au bout de 18 jours ont été observés chez cette patiente.

TROISIEME PARTIE : Discussion

Les CAR-T cells représentent une nouvelle approche d'immunothérapie anti-tumorale dont l'efficacité dans les hémopathies malignes B a conduit à leur autorisation de mise sur le marché. Aujourd'hui quatre médicaments ont obtenu l'AMM en Europe : le Tisagenlecleucel (Kymriah®) dans les LAL-B réfractaires ou en rechute et dans les lymphomes B non Hodgkiniens, l'Axicabtagene ciloleucel (Yescarta®) dans les lymphomes B non Hodgkiniens, le Brexucabtagene autoleucel (Tecartus®) dans les lymphomes du manteau et le Lisocabtagene maraleucel (Breyanzi®) dans les lymphomes B non Hodgkiniens et les lymphomes folliculaires.

L'utilisation du Tisagenlecleucel (Kymriah®) pour traiter les LAL-B récidivantes ou réfractaires de l'enfant et de l'adulte jeune (moins de 25ans) a permis d'obtenir des taux de rémission complète élevés allant de 80 à 93% selon les études. Cependant environ 40% de ces patients vont présenter une rechute dans les douze mois suivant le traitement (16).

Plusieurs travaux ont démontré que l'efficacité anti-tumorale dépend principalement de la capacité d'expansion et de persistance des CAR-T cells (82). En effet, après rencontre de l'antigène cible, l'étape de prolifération des CAR-T cells est indispensable pour obtenir un rapport de cellules effectrices sur cellules cibles satisfaisant, permettant d'éliminer l'intégralité des cellules tumorales et obtenir une rémission complète.

La persistance des CAR-T cells quant à elle, permet de maintenir le contrôle sur la maladie et représente un facteur prédictif de rémission de longue durée. Cette dernière peut être prédite par la durée de l'aplasie de la lignée B (72) (83). Dans la cohorte de Muller et al. une expansion deux fois plus élevée associée à une persistance des CAR-T cells au-delà de 24 mois ont été observées dans le groupe des patients en rémission (84).

Toutes ces données témoignent de l'importance du développement du suivi des CAR-T cells au laboratoire, afin de caractériser les deux étapes clés qui conditionnent l'efficacité anti-tumorale et la durée de la rémission, mais également qui prédisposent au développement de la toxicité. Les outils de biologie moléculaire présentent une sensibilité élevée permettant de détecter de très faible niveau de transgène codant pour le CAR (85). Bien que ces techniques soient plus faciles à mettre en place, le taux des CAR-T cells fonctionnels peut être surestimé. Ceci s'explique par le fait que les techniques de biologie moléculaire mesurent l'intégration du

transgène dans le génome des lymphocytes T sans évaluer l'expression membranaire du récepteur chimérique fonctionnel (85).

Comparée à la biologie moléculaire, les protocoles utilisant la cytométrie en flux offrent de multiples intérêts. En effet, cette technique permet d'analyser la répartition des différentes populations lymphocytaires T/B/NK, de quantifier uniquement les cellules T qui expriment à leur surface un CAR fonctionnel et d'analyser leur phénotype (naïfs ou mémoires), les différents marqueurs membranaires exprimés (marqueurs d'activation (CD25) et d'épuisement) ainsi que leur fonctionnalité (cytokines intracellulaires et molécules cytotoxiques) (73) (86) (87). Une analyse de la cinétique des CAR-T cells est également possible, en déterminant le temps au bout duquel ces cellules sont détectables (T first), le pic d'expansion (Cmax), le temps au bout duquel il est atteint (Tmax) et le dernier point auquel les CAR-T cells sont détectables (T last), qui définit la durée de la persistance du médicament *in vivo* (73).

La sensibilité de détection de cette technique est plus faible par rapport à la biologie moléculaire et dépend principalement du réactif utilisé. Schanda et al. ont étudié quatre réactifs de détection : F(ab')₂, la protéine L, la protéine CD19 recombinante de ACROBiosystem et la protéine CD19 recombinante de Miltenyi Biotec. Leurs travaux ont démontré que le réactif développé par le laboratoire Miltenyi Biotec permet d'avoir une meilleure discrimination de la sous-population des cellules CAR-T avec une sensibilité et une spécificité de détection supérieures comparées aux autres réactifs étudiés. Ainsi, ce dernier est actuellement utilisé pour le suivi des CAR-T cells au laboratoire (81) (88).

L'intérêt du dosage des cytokines a été récemment mis en évidence grâce à de nombreuses études qui ont montré qu'il existe une association entre le taux de certaines cytokines inflammatoires et le développement des effets indésirables. Des techniques d'ELISA classiques, de fluorimétrie (Luminex) et l'utilisation croissante d'automates dotés d'une meilleure sensibilité tels que le Ella® (Ella® Automated Immunoassay System, R&D systems, Minneapolis, Minnesota, États-Unis) ou le Simoa® (Single Molecule Arrays, Quanterix, Billerica, Massachusetts, États-Unis) ont été développés et permettent de doser simultanément des panels de cytokines sur de larges gammes de concentrations (75).

Les thérapies cellulaires à base de CAR-T cells sont des "médicaments vivants" qui présentent un profil cinétique unique différent du modèle pharmacocinétique classique. La première analyse détaillée de la cinétique du Tisagenlecleucel (Kymriah®) a été rapportée en 2018 par l'équipe de Muller et al. à travers l'analyse des données d'une large cohorte regroupant 79

patients pédiatriques issues des essais ENSIGN et ELIANA (84). Après perfusion, les CAR-T cells ont été immédiatement détectés dans le sang périphérique par des techniques de PCR quantitatives et de cytométrie en flux chez l'ensemble des patients. Une régression transitoire a été observée qui correspond à la phase de distribution du médicament dans l'organisme (la moelle osseuse, le LCR et les organes lymphoïdes secondaires), dans le but de rencontrer l'antigène cible et de proliférer. Dans le groupe des patients qui présentaient une bonne réponse au traitement, le pic d'expansion a été atteint rapidement en moyenne au bout de 10 jours suivant la perfusion et plus tardivement en moyenne au bout de 20 jours chez les patients non répondeurs (70) (84). Dans notre étude, le profil cinétique des CAR-T cells obtenu chez les deux patientes grâce au protocole utilisant la cytométrie en flux, était comparable aux résultats des patients en rémission retrouvés dans la littérature (70) (84). Après perfusion, une distribution des CAR-T cells dans la moelle osseuse et dans le LCR a été observée chez les deux patientes étudiées, suivi d'une phase de prolifération durant les dix premiers jours permettant d'atteindre rapidement un pic d'expansion à J10 chez la première patiente et à J8 chez la seconde patiente. Au moment du pic d'expansion, Muller et al. ont retrouvé en moyenne 32% de cellules CAR-T (pour 100 lymphocytes T) chez les patients qui ont présenté une bonne réponse initiale (70). Dans notre étude, des taux plus élevés ont été observés (57% et 71%) prouvant que les CAR-T cells ont proliféré chez les deux patientes et ont permis d'obtenir une rémission cytologique complète au myélogramme et une maladie résiduelle indétectable au seuil de 10^{-4} un mois après la perfusion du Tisagenlecleucel (Kymriah®). Cependant, pour une meilleure appréciation de la capacité d'expansion, le taux des CAR-T cells a été évalué en valeurs absolues (éléments/mm³). Une expansion cellulaire plus faible a été retrouvée chez la première patiente de notre étude, étant probablement à l'origine de la disparition rapide du médicament dans les trois mois suivant la perfusion. L'équipe de Muller et al. a démontré que la perte précoce de l'aplasie de la lignée B (< 6mois) secondaire à la disparition des CAR-T cells fonctionnels, est associée à un risque élevé de rechute (84). Dans ce contexte d'autres études ont montré l'intérêt d'utiliser ces derniers comme traitement intermédiaire avant la greffe de CSH (*bridge à la transplantation*). Les travaux de Summers et al. ont mis en évidence une amélioration significative du taux de survie sans rechute après greffe de CSH chez les patients présentant une persistance limitée des CAR-T cells, inférieure à 6 mois (63 jours) (89). De même, chez les patients à hauts risque de rechutes (BCR-ABL +, mutation TP53, maladie extra médullaire), les taux de survie sans événements à douze mois étaient significativement supérieurs chez les patients qui ont bénéficié d'une greffe de CSH après traitement par CAR-T cells (77%) par rapport à ceux qui ont reçu uniquement le traitement par Tisagenlecleucel

(Kymriah®) (12%) (90). Dans notre étude, les deux patientes ont été greffées. La patiente n°1 présente actuellement une rémission complète avec une reconstitution de l'hématopoïèse. La deuxième patiente a bénéficié de deux greffes d'USP (unité de sang placentaire) ; une rémission complète a été obtenue à l'issue de la deuxième greffe mais sans reconstitution totale de l'hématopoïèse, avec une persistance à ce jour d'une anémie et d'une thrombopénie.

De nombreuses études ont permis d'identifier des facteurs spécifiques aux patients, ou aux CAR-T cells utilisés, comme étant impliqués dans l'hétérogénéité de la réponse et des effets indésirables observés (33). Le phénotype et la quantité des lymphocytes T obtenus au moment de l'aphérèse conditionnent en grande partie l'efficacité anti-tumorale des CAR-T cells produits. Après activation par un antigène, un lymphocyte T naïf (TN) se différencie en lymphocyte T souche mémoire (TsCM) puis T central mémoire (TCM), T effecteur mémoire (TEM) et enfin en T effecteur mémoire terminal (TEMRA). En raison de leurs propriétés d'auto-renouvellements, les lymphocytes TN et TsCM ont une meilleure capacité de prolifération et de persistance que les T mémoires différenciés, qui acquièrent au fur et à mesure de leurs différenciations en TCM, TEM et TEMRA des propriétés cytotoxiques croissantes au détriment de leurs capacités prolifératives (91). Les chimiothérapies intensives et répétées, altèrent le phénotype et la fonctionnalité des lymphocytes T par la déplétion des cellules T naïves ou mémoires précoces (CCR7⁺ CD27⁺), entraînant un défaut d'expansion *in vitro* des lymphocytes T et une moindre expansion *in vivo* des CAR-T cells produits, responsable d'une activité anti-tumorale insuffisante et d'une persistance *in vivo* limitée (92) (93) (94). De même, Finney et al. ont observés qu'une augmentation d'expression des marqueurs d'épuisement tels que CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4*), PD-1 (*programmed cell death protein 1*), Tim-3 (*T-cell immunoglobulin mucin domain-3*), Lag3 (*lymphocyte-activation protein 3*) sur les cellules T, était associé à une perte précoce des CAR-T cells à l'origine des rechutes observées (95). Chez les deux patientes étudiées, un bon rendement de lymphocytes T (CD3⁺) a été obtenu lors de la leucaphérèse. Cependant aucune analyse étendue du phénotype n'a été réalisée sur le produit d'aphérèse, sur les CAR-T cells produits ou sur les CAR-T cells *in vivo*.

Les deux patientes de notre étude ont reçu une seule perfusion de Tisagenlecleucel (Kymriah®), CAR-T cells de deuxième génération constitué d'un domaine de costimulation de type 4-1BB (CD137). Il a été mis en évidence dans la littérature que le type de domaine de costimulation peut avoir des effets distincts sur la susceptibilité à l'activation et à l'épuisement des CAR-T cells. *In vitro* le domaine de costimulation CD28 conduit à une différenciation des cellules T vers un phénotype effecteur (CD45RO⁺ CCR7⁻) et facilite leur épuisement qu'il soit induit par

une signalisation indépendante de l'antigène ou par une exposition persistante à l'antigène. Au contraire le domaine 4-1BB, préserve la capacité répliquative des cellules mémoires précoces (CD45RO- CCR7+) et évite l'épuisement des CAR-T cells (96) (97) . Maude et al. ont mis en évidence que les CAR-T cells constitués d'un domaine de costimulation 4-1BB présentent une expansion *in vivo* moins élevée et moins rapide mais persistent plus longtemps durant des mois voire des années (41). A l'inverse, l'équipe de Park et al. a constaté que les CAR-T cells composés par le domaine de costimulation CD28, présentent une persistance *in vivo* limitée à environ deux semaines, mais une expansion plus importante très souvent à l'origine du développement des effets indésirables graves (65). Dans notre étude, malgré l'utilisation de cellules CAR-T avec un domaine de costimulation 4-1BB chez les deux patientes, une disparition précoce du médicament a été observée chez la patiente n°1 après trois mois de la perfusion justifiant la nécessité d'une greffe de CSH devant le haut risque de rechute. Cet exemple appuie l'hypothèse qu'il existe une multitude de facteurs qui peuvent conditionner la cinétique des CAR-T cells aussi bien liés au patient ou au médicament lui-même. De plus, Park et al. ont mis en évidence que la structure du CAR peut influencer le type de rechute dans les LAL-B. Les rechutes avec conservation de l'antigène CD19 sur les cellules leucémiques sont plus précoces et sont plus souvent retrouvées avec les cellules CAR-T CD28 (65). À l'inverse, les rechutes tardives avec perte de l'antigène cible CD19 sont plus souvent observées après traitement par des cellules CAR-T 4-1BB. Ceci pourrait être expliqué par la pression immune prolongée qui conduit à la sélection d'un clone CD19 négatif (16).

La masse tumorale présente au moment de la perfusion des CAR-T cells fait également partie des facteurs prédictifs de la réponse anti-tumorale. L'équipe de Muller et al. et de Park et al. ont mis en évidence l'existence d'une association significative entre le taux des CAR-T cells au pic et la masse tumorale avant la perfusion (à J-1) (83,84) . En effet une expansion plus rapide et plus intense permettant d'atteindre des concentrations très élevées au pic ont été retrouvés chez les patients présentant une masse tumorale élevée (>50% de blastes dans la MO). Dans notre étude, la charge tumorale n'a pas été évaluée immédiatement avant la perfusion du Tisagenlecleucel (Kymriah®) mais deux semaines avant la perfusion, retrouvant 64% de blastes au myélogramme chez la première patiente et 86% de blastes chez la deuxième patiente. Si l'on suppose que le pourcentage des cellules pathologiques n'a pas diminué jusqu'à la réinjection des CAR-T cells on pourrait associer l'intensité de l'expansion observée chez la patiente n°2 à la masse tumorale.

Taraseviciute et al. ont étudié l'impact de l'utilisation antérieure du Blinatumomab, anticorps bispécifique, sur l'efficacité des CAR-T cells. Ils ont mis en évidence que ce dernier peut être à l'origine d'une expansion insuffisante et favoriser les rechutes CD19 négatives (98,99). Dans notre étude, les deux patientes ont été traitées selon des protocoles de chimiothérapies conventionnels sans avoir eu recours aux immunothérapies avant le traitement par CAR-T cells. Enfin, Mejzner et al. ont montré que la lymphodéplétion par l'association « fludarabine et cyclophosphamide » telle que réalisée chez nos patientes, est indispensable à l'augmentation des cytokines homéostatiques IL-7 et IL-15 favorables à l'expansion *in vivo* des CAR-T cells. Cependant ce type de lymphodéplétion a été également associé au risque plus élevé de développement des effets indésirables (33) (100).

Après perfusion des CAR-T cells, le syndrome de relargage cytokinique (SRC) est l'effet indésirable le plus fréquemment observé. Son incidence globale est élevée allant de 76% à 93% avec une forme sévère retrouvée dans 23 à 46% des cas. Dans l'étude ELIANA, parmi les patients ayant présenté un SRC (77%), 59 % ont été admis en unité de réanimation médicale pour une médiane de 8 jours et 51 % ont reçu du Tocilizumab (16) (56) (82) (83) (33). Les deux patientes de notre étude ont développé des SRC d'intensité différente. La patiente n°2 a présenté une toxicité sévère de grade 3 accompagnée d'un syndrome d'activation macrophagique et d'une CIVD biologique. L'ensemble a entraîné une défaillance multiviscérale ayant nécessité un séjour en réanimation. Muller et al. ont mis en évidence l'existence d'une corrélation entre le taux des CAR-T cells au pic et la gravité du SRC observé. Ils ont montré que des grades élevés de SRC (grades 3, 4) ayant nécessités un séjour en réanimation sont retrouvés chez les patients avec une expansion cellulaire élevée et une masse tumorale importante au moment de la perfusion des CAR-T cells (supérieur à 50% de blastes) (70) (84). Des faits identiques ont été observés dans notre étude. En effet l'expansion très élevée des CAR-T cells retrouvée chez la patiente n°2 était probablement à l'origine de la sévérité du SRC observé.

Cet effet indésirable est caractérisé par une production élevée de cytokines pro-inflammatoires à la suite de l'activation des CAR-T cells après rencontre de l'antigène cible. L'équipe de Teachey et al. a montré qu'il semble possible de prédire la survenue d'un SRC sévère par une signature cytokinique basée sur le ratio entre les valeurs basales et à J3 post-injection des CAR-T cells de trois cytokines (IFN- γ , CCL3, IL-13) (101). De même, une corrélation entre le taux d'IL-6 et la sévérité du SRC a été établi justifiant l'utilisation du traitement par l'anticorps anti-

IL-6, le tocilizumab (70). Cependant dans notre étude aucun dosage de cytokines n'a été réalisé chez les deux patientes.

La neurotoxicité correspond au second effet indésirable le plus fréquent qui a été retrouvé chez environ 25 à 50% des patients, avec une forme sévère dans 13% à 50% des cas en fonction des études (16) (33) (83). Cette toxicité succède généralement à la survenue préliminaire d'un SRC sévère et aux facteurs qui favorisent ce dernier, tels que la masse tumorale élevée, le pic d'expansion élevé et le type de domaine de costimulation (CD28) (102). Elle est caractérisée par une inflammation systémique avec production de cytokines inflammatoires entraînant une cascade d'activation des cellules endothéliales et une altération de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique, facilitant le passage des CAR-T cells vers le système nerveux central. Sa survenue plus fréquente avec les CAR-T cells anti-CD19 a été récemment expliquée par les travaux de Parker et al. montrant que les cellules murales qui soutiennent les vaisseaux du cerveau, les péricytes et les cellules musculaire lisses, expriment à faibles taux des antigènes CD19 (103). Dans notre étude, la première patiente a développé une neurotoxicité sévère de grade 3 retrouvant dans le LCR à J6, une infiltration lymphocytaire de type CD3+ dont 85% des cellules étaient des CAR-T cells. Il est important de noter que cette patiente présentait un terrain neurologique fragile avec des antécédents d'encéphalopathie mixte ayant nécessité la mise sous traitements. Ceci rend difficile le fait d'attribuer la gravité de la neurotoxicité observée, uniquement à l'infiltration des CAR-T cells dans le LCR. De plus, les études à ce sujet sont contradictoires. En effet Gust et al. ont analysé les tissus cérébraux des deux patients qui ont succombé à la suite d'une neurotoxicité sévère. Ils ont retrouvé une forte infiltration des CAR-T cells associée à la présence d'autres cellules immunes dans les biopsies analysées (62). A l'inverse, chez un autre patient qui a développé un œdème cérébral fatal dans le cadre de l'essai ROCKET, l'équipe de Gilbert et al. n'a pas retrouvé d'infiltration cellulaire dans le système nerveux central. A ce jour, la physiopathologie exacte de cet effet indésirable demeure mal connue justifiant les nombreux essais en cours (104). Les travaux de Santomasso et al. ont montré que des taux élevés de cytokines inflammatoires (IL-6, IL-8, MCP1, IP1) retrouvés dans le sang et dans le LCR à J3 post réinjection des CAR-T cells sont plus souvent observés dans les cas sévères de neurotoxicité (105). De même, des études évaluant l'efficacité de l'épuration extrarénale des cytokines dans le traitement du SRC et neurotoxicité sont en cours, ce qui confirme le rôle central des cytokines dans la physiologie de ces effets indésirables et justifie le développement du monitoring cytokinique chez chaque patient traité (106).

Enfin les deux patientes ont été traitées par du tocilizumab et des corticoïdes. Kotch et al. ont mis en évidence que l'administration des biothérapies anti-IL-6 pour la prise en charge des complications secondaires aux CAR-T cells n'affecte pas l'expansion et la persistance de ces derniers (60). Cependant les données restent limitées concernant l'utilisation des corticoïdes. Ainsi il est recommandé d'utiliser ces molécules à faibles doses et pendant des durées courtes afin de limiter leur impact sur la cinétique des CAR-T cells (84).

Conclusion et perspectives

Les CAR-T cells ciblant l'antigène CD19, représentent une nouvelle catégorie d'immunothérapie qui constitue une révolution dans le traitement des hémopathies lymphoïdes B. L'efficacité anti-tumorale de ces thérapies cellulaires dépend principalement de leur capacité de prolifération et de persistance *in vivo*. Certaines caractéristiques spécifiques aux patients (la nature de l'hémopathie, la masse tumorale, les traitements antérieurs et la qualité du produit d'aphérèse) ou au type de construction du CAR ont été identifiées comme étant des facteurs prédictifs pouvant favoriser l'efficacité du traitement mais également le développement des effets indésirables. Par conséquent un suivi personnalisé de chaque patient est indispensable tout au long de son parcours de soin ; depuis la leucaphérèse jusqu'à la rémission clinique. Pour cela, des protocoles utilisant des techniques de cytométrie en flux, de biologie moléculaire mais également des dosages de cytokines inflammatoires ont été développés. A ce jour, il n'existe pas de recommandations de suivi en vie réelle chez les patients traités hors essai cliniques. Compte tenu de l'enjeu clinique et économique de ces nouvelles stratégies thérapeutiques, il semble important d'harmoniser les explorations biologiques afin de pouvoir réaliser des études multicentriques chez des patients moins sélectionnés que dans les essais cliniques. Ces données permettront à terme d'apporter une meilleure compréhension des complications sévères mais également d'identifier des biomarqueurs prédictifs qui faciliteraient une prise en charge précoce des effets indésirables et de repérer rapidement les patients à haut risque de rechute ou d'échec thérapeutique.

Enfin, grâce à l'amélioration des techniques d'ingénierie cellulaire, des CAR-T cells plus efficaces et plus persistants, aux toxicités moindres, et ciblant un ou plusieurs antigènes B grâce aux constructions bispécifiques (CD19, CD20, CD22) sont en plein développement. De même des approches allogéniques utilisant des lymphocytes T issus de donneurs sains sont en cours d'essais facilitant l'accès plus rapide à la thérapie.

BIBLIOGRAPHIE

1. Rabian F, Boissel N. LAL chez l'adulte : apport et limite de la prise en charge pédiatrique. *Bull Cancer (Paris)*. 1 févr 2021;108(2):187-97.
2. Ma Q, Zhang J, O'Brien E, Martin AL, Agostinho AC. Tisagenlecleucel versus historical standard therapies for pediatric relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *J Comp Eff Res*. août 2020;9(12):849-60.
3. Kuby_Immunology_pdf.pdf.
4. Galaine J, Godet Y, Adotévi O. Pour comprendre : l'activation lymphocytaire T. *Bull Cancer (Paris)*. 1 nov 2016;103:S127-31.
5. Catros V. Les CAR-T cells, des cellules tueuses spécifiques d'antigènes tumoraux - De nouvelles générations pour le traitement des tumeurs solides. *médecine/sciences*. 1 avr 2019;35(4):316-26.
6. Costello RT, Gastaut JA, Olive D. Mécanismes d'échappement tumoral à la réponse immunitaire. *Rev Médecine Interne*. 1 juill 1999;20(7):579-88.
7. Singh AK, McGuirk JP. CAR T cells: continuation in a revolution of immunotherapy. *Lancet Oncol*. 1 mars 2020;21(3):e168-78.
8. Règlement (CE) n° 1394/2007 du Parlement européen et du Conseil du 13 novembre 2007 concernant les médicaments de thérapie innovante et modifiant la directive 2001/83/CE ainsi que le règlement (CE) n° 726/2004 (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE) [Internet]. OJ L nov 13, 2007. Disponible sur: <http://data.europa.eu/eli/reg/2007/1394/oj/fra>
9. Zhang C, Liu J, Zhong JF, Zhang X. Engineering CAR-T cells. *Biomark Res*. 24 juin 2017;5(1):22.
10. 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*. 1 déc 1989;86(24):10024-8.
11. 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*. 15 janv 1993;90(2):720-4.
12. Cooper LJN, Topp MS, Serrano LM, Gonzalez S, Chang WC, Naranjo A, et al. T-cell clones can be rendered specific for CD19: toward the selective augmentation of the graft-versus-B-lineage leukemia effect. *Blood*. 15 févr 2003;101(4):1637-44.
13. Kochenderfer JN, Wilson WH, Janik JE, Dudley ME, Stetler-Stevenson M, Feldman SA, et al. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood*. 18 nov 2010;116(20):4099-102.
14. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia. *N Engl J Med*. 25 août 2011;365(8):725-33.

15. Novartis Pharmaceuticals. A Phase II, Single Arm, Multicenter Trial to Determine the Efficacy and Safety of CTL019 in Pediatric Patients With Relapsed and Refractory B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia [Internet]. clinicaltrials.gov; 2021 oct [cité 25 janv 2022]. Report No.: NCT02435849. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02435849>
16. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. févr 2018;378(5):439-48.
17. Geyer MB. First CAR to Pass the Road Test: Tisagenlecleucel's Drive to FDA Approval. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 févr 2019;25(4):1133-5.
18. 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):1109-18.
19. Guest RD, Hawkins RE, Kirillova N, Cheadle EJ, Arnold J, O'Neill A, et al. The role of extracellular spacer regions in the optimal design of chimeric immune receptors: evaluation of four different scFvs and antigens. *J Immunother Hagerstown Md* 1997. juin 2005;28(3):203-11.
20. Brocker T. Chimeric Fv-zeta or Fv-epsilon receptors are not sufficient to induce activation or cytokine production in peripheral T cells. *Blood*. 1 sept 2000;96(5):1999-2001.
21. van der Stegen SJC, Hamieh M, Sadelain M. The pharmacology of second-generation chimeric antigen receptors. *Nat Rev Drug Discov*. juill 2015;14(7):499-509.
22. Zhao Z, Condomines M, van der Stegen SJC, Perna F, Kloss CC, Gunset G, et al. Structural Design of Engineered Costimulation Determines Tumor Rejection Kinetics and Persistence of CAR T Cells. *Cancer Cell*. 12 oct 2015;28(4):415-28.
23. Hombach AA, Abken H. Costimulation by chimeric antigen receptors revisited the T cell antitumor response benefits from combined CD28-OX40 signalling. *Int J Cancer*. 15 déc 2011;129(12):2935-44.
24. Chmielewski M, Abken H. TRUCKs: the fourth generation of CARs. *Expert Opin Biol Ther*. 2015;15(8):1145-54.
25. 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*. 1 sept 2011;71(17):5697-706.
26. Levine BL. Performance-enhancing drugs: design and production of redirected chimeric antigen receptor (CAR) T cells. *Cancer Gene Ther*. févr 2015;22(2):79-84.
27. Wang X, Rivière I. Clinical manufacturing of CAR T cells: foundation of a promising therapy. *Mol Ther - Oncolytics*. 1 janv 2016;3:16015.
28. Jin C, Fotaki G, Ramachandran M, Nilsson B, Essand M, Yu D. Safe engineering of CAR T cells for adoptive cell therapy of cancer using long-term episomal gene transfer. *EMBO Mol Med*. juill 2016;8(7):702-11.
29. Rubio MT, Galaine J, Borg C, Daguindau É. Biologie, concepts et principes des CAR-T cells. *Bull Cancer (Paris)*. déc 2018;105:S135-46.

30. Kebriaei P, Singh H, Huls MH, Figliola MJ, Bassett R, Olivares S, et al. Phase I trials using Sleeping Beauty to generate CD19-specific CAR T cells. *J Clin Invest*. 2 août 2016;126(9):3363-76.
31. Nawaz W, Xu S, Li Y, Huang B, Wu X, Wu Z. Nanotechnology and immunoengineering: How nanotechnology can boost CAR-T therapy. *Acta Biomater*. 1 juin 2020;109:21-36.
32. Grinda T, Brouard J, Tran D, Rubio MT. Mécanismes de résistance et d'échappement aux cellules CAR-T. *Bull Cancer (Paris)*. oct 2021;108(10):S128-40.
33. Gardner RA, Finney O, Annesley C, Brakke H, Summers C, Leger K, et al. Intent-to-treat leukemia remission by CD19 CAR T cells of defined formulation and dose in children and young adults. *Blood*. 22 juin 2017;129(25):3322-31.
34. Alcazer V, Depil S. Développement des CAR-T allogéniques. *Bull Cancer (Paris)*. 1 oct 2021;108(10, Supplement):S73-80.
35. Schuster SJ, Svoboda J, Chong EA, Nasta SD, Mato AR, Anak Ö, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas. *N Engl J Med*. 28 déc 2017;377(26):2545-54.
36. Depil S, Duchateau P, Grupp SA, Mufti G, Poirot L. 'Off-the-shelf' allogeneic CAR T cells: development and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. mars 2020;19(3):185-99.
37. Qasim W, Zhan H, Samarasinghe S, Adams S, Amrolia P, Stafford S, et al. Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. *Sci Transl Med [Internet]*. 25 janv 2017 [cité 6 févr 2022]; Disponible sur: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/scitranslmed.aaj2013>
38. Qasim W, Zhan H, Samarasinghe S, Adams S, Amrolia P, Stafford S, et al. Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. *Sci Transl Med*. 25 janv 2017;9(374):eaaj2013.
39. Institut de Recherches Internationales Servier. A Phase 1, Open Label, Non-comparative Study to Evaluate the Safety and the Ability of UCART19 to Induce Molecular Remission in Paediatric Patients With Relapsed/Refractory B-cell Acute Lymphoblastic Leukaemia [Internet]. clinicaltrials.gov; 2021 sept [cité 3 févr 2022]. Report No.: NCT02808442. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02808442>
40. Fry TJ, Shah NN, Orentas RJ, Stetler-Stevenson M, Yuan CM, Ramakrishna S, et al. CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy. *Nat Med*. janv 2018;24(1):20-8.
41. Grupp SA, Maude SL, Rives S, Baruchel A, Boyer MW, Bittencourt H, 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*. 29 nov 2018;132:895.
42. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, Waller EK, Borchmann P, McGuirk JP, et al. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 3 janv 2019;380(1):45-56.
43. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 28 déc 2017;377(26):2531-44.

44. Han D, Xu Z, Zhuang Y, Ye Z, Qian Q. Current Progress in CAR-T Cell Therapy for Hematological Malignancies. *J Cancer*. 1 janv 2021;12(2):326-34.
45. Godwin JE, Mattar B, Maris M, Bachier C, Stevens D, Hoda D, et al. Outreach: Results from a Phase 2 Study of Lisocabtagene Maraleucel (liso-cel) Administered As Inpatient (Inpt) or Outpatient (Outpt) Treatment in the Nonuniversity Setting in Patients (Pts) with R/R Large B-Cell Lymphoma (LBCL). *Blood*. 23 nov 2021;138:1762.
46. Research C for DE and. FDA approves lisocabtagene maraleucel for relapsed or refractory large B-cell lymphoma. FDA [Internet]. 6 nov 2021 [cité 30 janv 2022]; Disponible sur: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-lisocabtagene-maraleucel-relapsed-or-refractory-large-b-cell-lymphoma>
47. Huang et al. - 2022 - Clinical Pharmacology Perspectives for Adoptive Ce.pdf.
48. Universalis E. LEUCÉMIES [Internet]. Encyclopædia Universalis. [cité 19 nov 2021]. Disponible sur: <https://www.universalis.fr/encyclopedie/leucemies/>
49. Imbert M, Ballon OW. Place du biologiste dans la prise en charge des leucémies aiguës : de l'hémogramme à la classification OMS. *Rev Francoph Lab*. 1 avr 2015;2015(471):83-90.
50. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 30 juill 2009;114(5):937-51.
51. Laboratoire d'Hématologie Cellulaire du CHU d'Angers [Internet]. [cité 15 févr 2022]. Disponible sur: <https://www.hematocell.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/64-enseignement-de-lhematologie-cellulaire-les-principales-maladies-hematologiques/classification-oms-2016-des-maladies-hematologiques-malignes/68-classification-oms-des-la-lymphoblastiques-et-des-la-de-lignee-ambigue>
52. LAL B classification EGIL.pdf.
53. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 19 mai 2016;127(20):2391-405.
54. Recommandations Leucémies aiguës de l'adulte [Internet]. VIDAL. [cité 20 févr 2022]. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/maladies/recommandations/leucemies-aigues-de-l-adulte-4055.html>
55. Cooper SL, Brown PA. Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatr Clin North Am*. févr 2015;62(1):61-73.
56. Rahal I, Cabannes-Hamy A, Boissel N. Traitement par CAR-T des leucémies aiguës de l'adulte. *Bull Cancer (Paris)*. déc 2018;105:S158-67.
57. CAR-T-cells-dans-le-traitement-des-Leucémies-Aiguës-Lymphoblastiques-de-l'enfant.pdf.
58. Grain A, Dourthe ME, Baruchel A. CAR-T cells et leucémies aiguës lymphoblastiques : avancées et questionnements. *Bull Cancer (Paris)*. févr 2020;107(2):234-43.

59. Tudesq JJ, Yakoub-Agha M, Bay JO, Courbon C, Paul F, Picard M, et al. Prise en charge du syndrome de relargage cytokinique et du syndrome d'activation macrophagique après traitement par CAR-T cells : recommandations de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC). *Bull Cancer (Paris)*. déc 2021;S0007455121004471.
60. Kotch C, Barrett D, Teachey DT. Tocilizumab for the treatment of chimeric antigen receptor T cell-induced cytokine release syndrome. *Expert Rev Clin Immunol*. 3 août 2019;15(8):813-22.
61. Neelapu SS, Tummala S, Kebriaei P, Wierda W, Gutierrez C, Locke FL, et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy — assessment and management of toxicities. *Nat Rev Clin Oncol*. janv 2018;15(1):47-62.
62. Gust J, Hay KA, Hanafi LA, Li D, Myerson D, Gonzalez-Cuyar LF, et al. Endothelial Activation and Blood–Brain Barrier Disruption in Neurotoxicity after Adoptive Immunotherapy with CD19 CAR-T Cells. *Cancer Discov*. 1 déc 2017;7(12):1404-19.
63. Gauthier J, Yakoub-Agha I. Chimeric antigen-receptor T-cell therapy for hematological malignancies and solid tumors: Clinical data to date, current limitations and perspectives. *Curr Res Transl Med*. 1 sept 2017;65(3):93-102.
64. Dai H, Wu Z, Jia H, Tong C, Guo Y, Ti D, et al. Bispecific CAR-T cells targeting both CD19 and CD22 for therapy of adults with relapsed or refractory B cell acute lymphoblastic leukemia. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol*. 3 avr 2020;13(1):30.
65. Park JH, Rivière I, Gonen M, Wang X, Sénéchal B, Curran KJ, et al. Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 1 févr 2018;378(5):449-59.
66. Fry TJ, Shah NN, Orentas RJ, Stetler-Stevenson M, Yuan CM, Ramakrishna S, et al. CD22-CAR T Cells Induce Remissions in CD19-CAR Naïve and Resistant B-ALL. *Nat Med*. janv 2018;24(1):20-8.
67. Dai H, Wu Z, Jia H, Tong C, Guo Y, Ti D, et al. Bispecific CAR-T cells targeting both CD19 and CD22 for therapy of adults with relapsed or refractory B cell acute lymphoblastic leukemia. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol*. 3 avr 2020;13(1):30.
68. Induction of resistance to chimeric antigen receptor T cell therapy by transduction of a single leukemic B cell | *Nature Medicine* [Internet]. [cité 28 mars 2022]. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/s41591-018-0201-9?sf199220346=1>
69. Hamieh M, Dobrin A, Cabriolu A, van der Stegen SJC, Giavridis T, Mansilla-Soto J, et al. CAR T cell trogocytosis and cooperative killing regulate tumour antigen escape. *Nature*. avr 2019;568(7750):112-6.
70. Mueller KT, Maude SL, Porter DL, Frey N, Wood P, Han X, et al. Cellular kinetics of CTL019 in relapsed/refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia and chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 23 nov 2017;130(21):2317-25.
71. Intent-to-treat leukemia remission by CD19 CAR T cells of defined formulation and dose in children and young adults | *Blood* | American Society of Hematology [Internet]. [cité 24 avr 2022]. Disponible sur: <https://ashpublications.org/blood/article/129/25/3322/107614/Intent-to-treat-leukemia-remission-by-CD19-CAR-T>

72. Schultz L. Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy for Pediatric B-ALL: Narrowing the Gap Between Early and Long-Term Outcomes. *Front Immunol* [Internet]. 2020 [cité 8 mars 2022];11. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.01985>
73. Rubio MT, Varlet P, Allain V, Ballot C, Cuffel A, Deschamps M, et al. Suivi immunologique des patients traités par cellules CAR-T pour hémopathie maligne: recommandations du groupe CARTi et de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC). *Bull Cancer (Paris)*. 1 déc 2021;108(12, Supplement):S53-64.
74. Aldo P, Marusov G, Svancara D, David J, Mor G. Simple Plex™: A Novel Multi-Analyte, Automated Microfluidic Immunoassay Platform for the Detection of Human and Mouse Cytokines and Chemokines. *Am J Reprod Immunol*. 2016;75(6):678-93.
75. Pescarmona R, Bulteau C, Garnier L. Suivi immunologique des traitements par cellules CAR-T. *Rev Francoph Lab*. 1 avr 2021;2021(531):34-9.
76. Mika T, Maghnouj A, Klein-Scory S, Ladigan-Badura S, Baraniskin A, Thomson J, et al. Digital-Droplet PCR for Quantification of CD19-Directed CAR T-Cells. *Front Mol Biosci* [Internet]. 2020 [cité 16 mars 2022];7. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmolb.2020.00084>
77. Wang H, Du X, Chen WH, Lou J, Xiao HL, Pan YM, et al. Establishment of a Quantitative Polymerase Chain Reaction Assay for Monitoring Chimeric Antigen Receptor T Cells in Peripheral Blood. *Transplant Proc*. 1 janv 2018;50(1):104-9.
78. Fehse B, Badbaran A, Berger C, Sonntag T, Riecken K, Geffken M, et al. Digital PCR Assays for Precise Quantification of CD19-CAR-T Cells after Treatment with Axicabtagene Ciloleucel. *Mol Ther - Methods Clin Dev*. 13 mars 2020;16:172-8.
79. Jena B, Maiti S, Huls H, Singh H, Lee DA, Champlin RE, et al. Chimeric Antigen Receptor (CAR)-Specific Monoclonal Antibody to Detect CD19-Specific T Cells in Clinical Trials. *PLOS ONE*. 1 mars 2013;8(3):e57838.
80. Chen PH, Lipschitz M, Weirather JL, Jacobson C, Armand P, Wright K, et al. Activation of CAR and non-CAR T cells within the tumor microenvironment following CAR T cell therapy. *JCI Insight*. 5(12):e134612.
81. Schanda N, Sauer T, Kunz A, Hückelhoven-Krauss A, Neuber B, Wang L, et al. Sensitivity and Specificity of CD19.CAR-T Cell Detection by Flow Cytometry and PCR. *Cells*. 17 nov 2021;10(11):3208.
82. Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *N Engl J Med*. 16 oct 2014;371(16):1507-17.
83. Park JH, Rivière I, Gonen M, Wang X, Sénéchal B, Curran KJ, et al. Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 1 févr 2018;378(5):449-59.
84. Mueller KT, Waldron E, Grupp SA, Levine JE, Laetsch TW, Pulsipher MA, et al. Clinical Pharmacology of Tisagenlecleucel in B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clin Cancer Res*. 13 déc 2018;24(24):6175-84.

85. Huang W, Li J, Liao MZ, Liu SN, Yu J, Jing J, et al. Clinical Pharmacology Perspectives for Adoptive Cell Therapies in Oncology. *Clin Pharmacol Ther* [Internet]. [cité 13 mars 2022];n/a(n/a). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cpt.2509>
86. High-Throughput Flow Cytometric Method for the Simultaneous Measurement of CAR-T Cell Characterization and Cytotoxicity against Solid Tumor Cell Lines - Emily M. Martinez, Samuel D. Klebanoff, Stephanie Secrest, Gabrielle Romain, Samuel T. Haile, Peter C. R. Emtage, Amy E. Gilbert, 2018 [Internet]. [cité 28 mars 2022]. Disponible sur: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/2472555218768745>
87. Aktas E, Kucuksezer UC, Bilgic S, Erten G, Deniz G. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell Immunol*. 1 janv 2009;254(2):149-54.
88. Sommer U, Eck S, Marszalek L, Stewart JJ, Bradford J, McCloskey TW, et al. High-sensitivity flow cytometric assays: Considerations for design control and analytical validation for identification of Rare events. *Cytometry B Clin Cytom*. 2021;100(1):42-51.
89. Summers C, Wu QV, Annesley C, Bleakley M, Dahlberg A, Narayanaswamy P, et al. Hematopoietic Cell Transplantation after CD19 Chimeric Antigen Receptor T Cell-Induced Acute Lymphoblastic Leukemia Remission Confers a Leukemia-Free Survival Advantage. *Transplant Cell Ther Off Publ Am Soc Transplant Cell Ther*. 1 janv 2022;28(1):21-9.
90. Zhang X, Lu X an, Yang J, Zhang G, Li J, Song L, et al. Efficacy and safety of anti-CD19 CAR T-cell therapy in 110 patients with B-cell acute lymphoblastic leukemia with high-risk features. *Blood Adv*. 26 mai 2020;4(10):2325-38.
91. Sommermeyer D, Hudecek M, Kosasih PL, Gogishvili T, Maloney DG, Turtle CJ, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8+ and CD4+ subsets confer superior antitumor reactivity in vivo. *Leukemia*. févr 2016;30(2):492-500.
92. Das RK, Vernau L, Grupp SA, Barrett DM. Naïve T-cell Deficits at Diagnosis and after Chemotherapy Impair Cell Therapy Potential in Pediatric Cancers. *Cancer Discov*. 1 avr 2019;9(4):492-9.
93. Fraietta JA, Lacey SF, Orlando EJ, Pruteanu-Malinici I, Gohil M, Lundh S, et al. Determinants of response and resistance to CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med*. mai 2018;24(5):563-71.
94. Cohen AD, Garfall AL, Stadtmauer EA, Melenhorst JJ, Lacey SF, Lancaster E, et al. B cell maturation antigen-specific CAR T cells are clinically active in multiple myeloma. *J Clin Invest*. 3 juin 2019;129(6):2210-21.
95. Finney OC, Brakke H, Rawlings-Rhea S, Hicks R, Doolittle D, Lopez M, et al. CD19 CAR T cell product and disease attributes predict leukemia remission durability. *J Clin Invest*. 1 mai 2019;129(5):2123-32.
96. Kawalekar OU, O'Connor RS, Fraietta JA, Guo L, McGettigan SE, Posey AD, et al. Distinct Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR T Cells. *Immunity*. 16 févr 2016;44(2):380-90.
97. Calderon H, Mamonkin M, Guedan S. Analysis of CAR-Mediated Tonic Signaling. In: Swiech K, Malmegrim KCR, Picanço-Castro V, éditeurs. *Chimeric Antigen Receptor T Cells: Development and Production* [Internet]. New York, NY: Springer US; 2020 [cité 8 mars 2022]. p. 223-36.

(Methods in Molecular Biology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0146-4_17

98. Pillai V, Muralidharan K, Meng W, Bagashev A, Oldridge DA, Rosenthal J, et al. CAR T-cell therapy is effective for CD19-dim B-lymphoblastic leukemia but is impacted by prior blinatumomab therapy. *Blood Adv.* 18 nov 2019;3(22):3539-49.
99. Taraseviciute A, Steinberg SM, Myers RM, Gore L, Lambie AJ, Brown PA, et al. Pre-CAR Blinatumomab Is Associated with Increased Post-CD19 CAR Relapse and Decreased Event Free Survival. *Blood.* 5 nov 2020;136:13-4.
100. Majzner RG, Mackall CL. Clinical lessons learned from the first leg of the CAR T cell journey. *Nat Med.* sept 2019;25(9):1341-55.
101. Teachey DT, Lacey SF, Shaw PA, Melenhorst JJ, Maude SL, Frey N, et al. Identification of Predictive Biomarkers for Cytokine Release Syndrome after Chimeric Antigen Receptor T-cell Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Discov.* juin 2016;6(6):664-79.
102. Santomasso BD, Park JH, Salloum D, Riviere I, Flynn J, Mead E, et al. Clinical and Biological Correlates of Neurotoxicity Associated with CAR T-cell Therapy in Patients with B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Discov.* 2 août 2018;8(8):958-71.
103. Parker KR, Migliorini D, Perkey E, Yost KE, Bhaduri A, Bagga P, et al. Single-Cell Analyses Identify Brain Mural Cells Expressing CD19 as Potential Off-Tumor Targets for CAR-T Immunotherapies. *Cell.* 1 oct 2020;183(1):126-142.e17.
104. Sheth VS, Gauthier J. Taming the beast: CRS and ICANS after CAR T-cell therapy for ALL. *Bone Marrow Transplant.* mars 2021;56(3):552-66.
105. Brudno JN, Kochenderfer JN. Recent advances in CAR T-cell toxicity: Mechanisms, manifestations and management. *Blood Rev.* 1 mars 2019;34:45-55.
106. Wallet F, Bachy E, Vassal O, Friggeri A, Bohe J, Garnier L, et al. Extracorporeal cytokine adsorption for treating severe refractory cytokine release syndrome (CRS). *Bone Marrow Transplant.* oct 2020;55(10):2052-5.

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 constituent une nouvelle forme d'immunothérapie en plein essor. Ce sont des lymphocytes T modifiés génétiquement afin d'être en mesure de reconnaître et de détruire les cellules cancéreuses. Des résultats très encourageants obtenus dans le traitement des Leucémies Aigües Lymphoblastiques B ont conduit à leur autorisation de mise sur le marché en France depuis 2018.

L'efficacité anti-tumorale des CAR-T cells est reliée principalement à leur capacité d'expansion et à leur persistance *in vivo*. Ces éléments dépendent eux-mêmes de caractéristiques spécifiques aux patients (comme la masse tumorale, la qualité du produit d'aphérèse...) mais également du type de construction du CAR. Ainsi, la mise en place dans les laboratoires du suivi de ces CAR-T est devenue cruciale et recommandé par la SFGM-TC. Pour cela, différents protocoles utilisant des techniques de biologie moléculaire, de cytométrie en flux (CMF), mais également des dosages de cytokines inflammatoires ont été développés.

Depuis deux ans, le laboratoire d'hématologie du CHU de Marseille a mis en place le suivi des CAR-T cells par CMF. Ce suivi a pour l'instant été réalisé chez deux patientes et a permis d'obtenir des résultats tout à fait cohérents avec les données observées dans la littérature.

A terme, le suivi de l'ensemble des paramètres immunologiques [numération T, B, NK ; Phénotypage T naïfs/mémoires ; marqueurs d'activations et d'épuisement] chez les patients recevant des CAR-T cells aura pour but d'optimiser la prédiction et la prise en charge des complications sévères de ces thérapies et d'identifier des facteurs biologiques permettant de prédire le risque d'échappement ou de rechute.

Mots clés : Immunothérapie, CAR-T cells, Leucémie aigüe lymphoblastique B, Cytométrie en flux.