

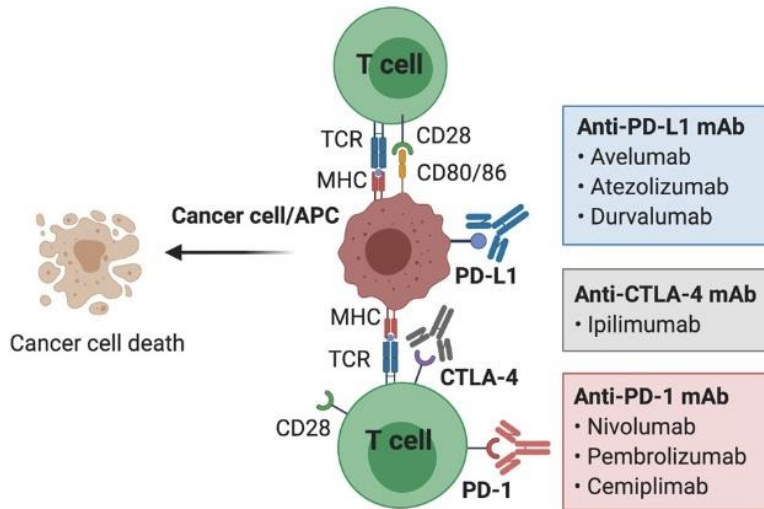


CytHem les questions sur le suivi des CAR-T: indications et monitoring des CAR-T dans un laboratoire d'Hématologie

Mikaël Roussel, Rennes

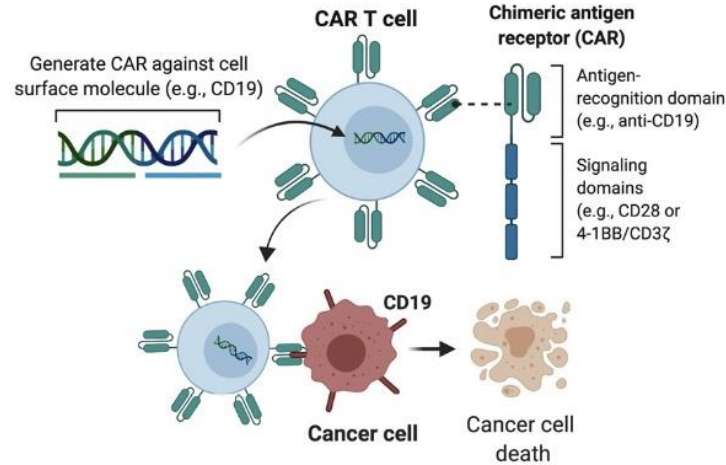
Comment éliminer les tumeurs à l'aide de lymphocytes T

Réactiver les LT spécifiques de la tumeur



→ Inhibiteurs de checkpoint

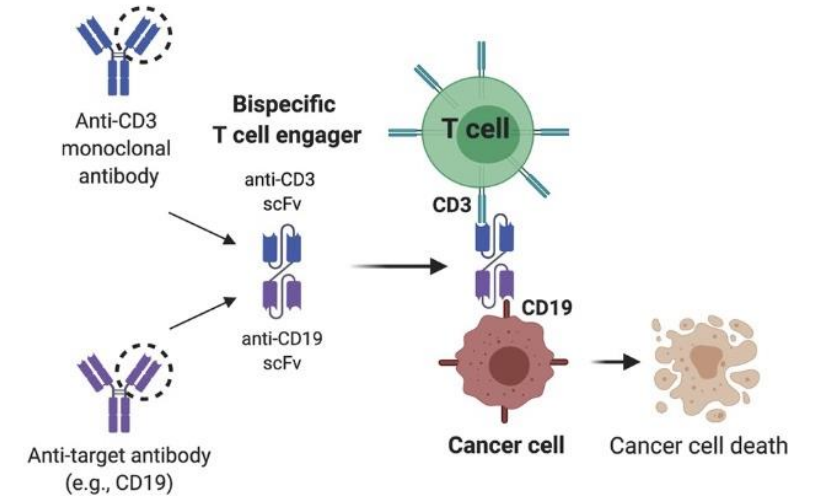
Apporter des effecteurs



→ CAR-T cells, TIL therapy

CD19: Axi-cel, Tisa-cel, Liso-cel
BCMA: Ide-cel, Cilta-cel

Rediriger les LT endogènes

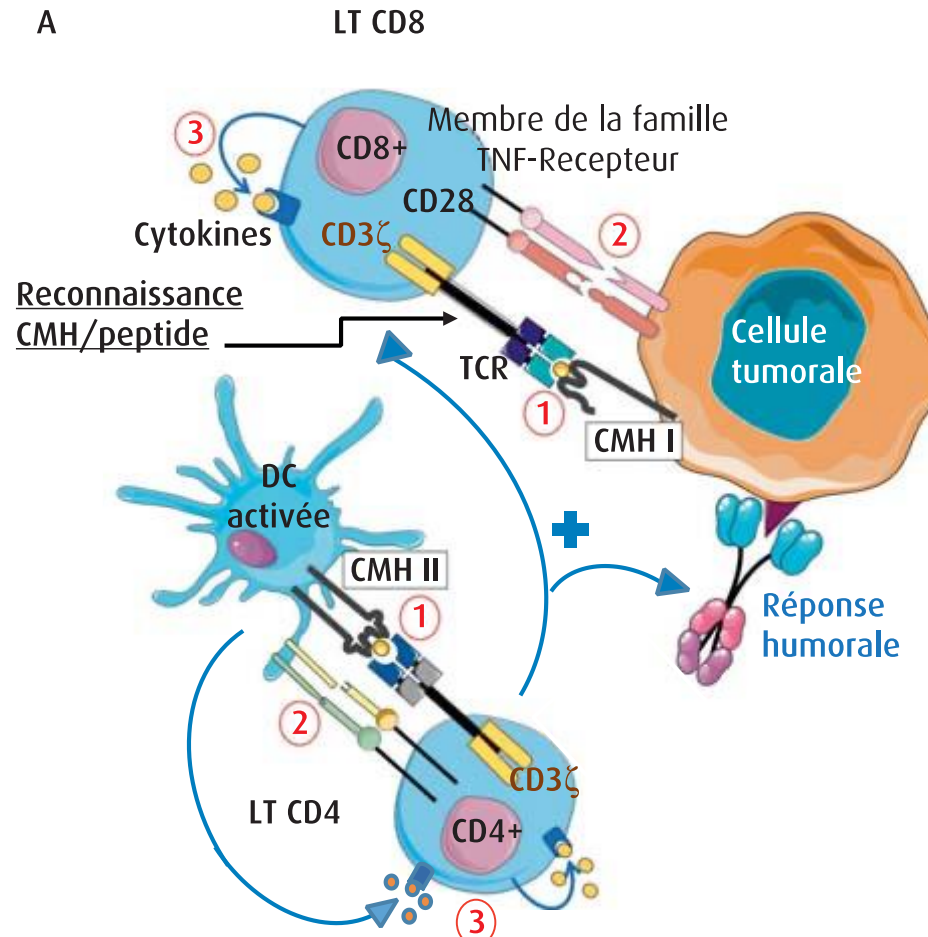


→ T-Cell Engagers = TCE

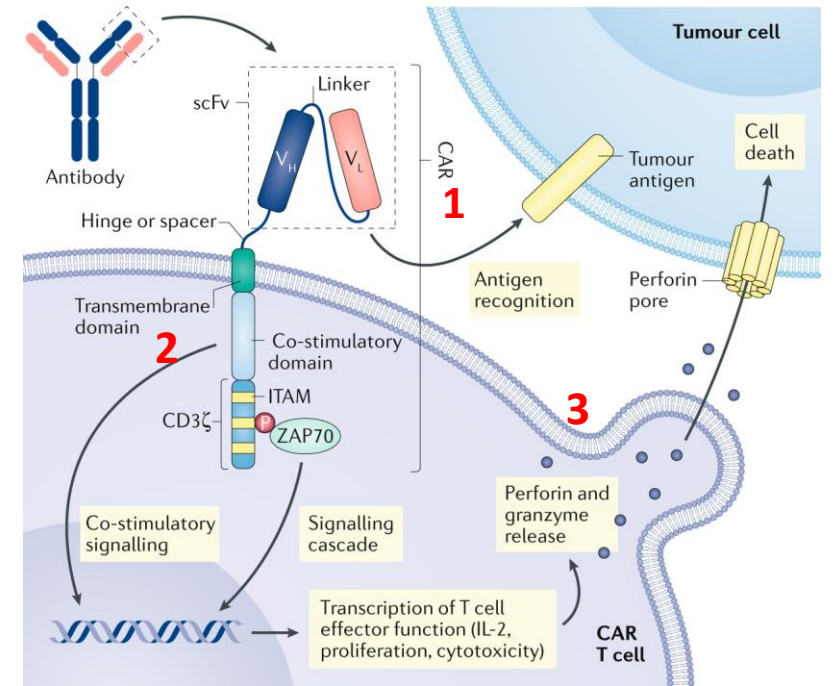
Bispecific antibodies

Glofitamab (CD3/CD20)
Epcoritamab (CD3/CD20)
Mosunetuzumab (CD3/CD20)
Blinatumomab (CD3/CD19)

Mécanismes d'actions des CAR-T

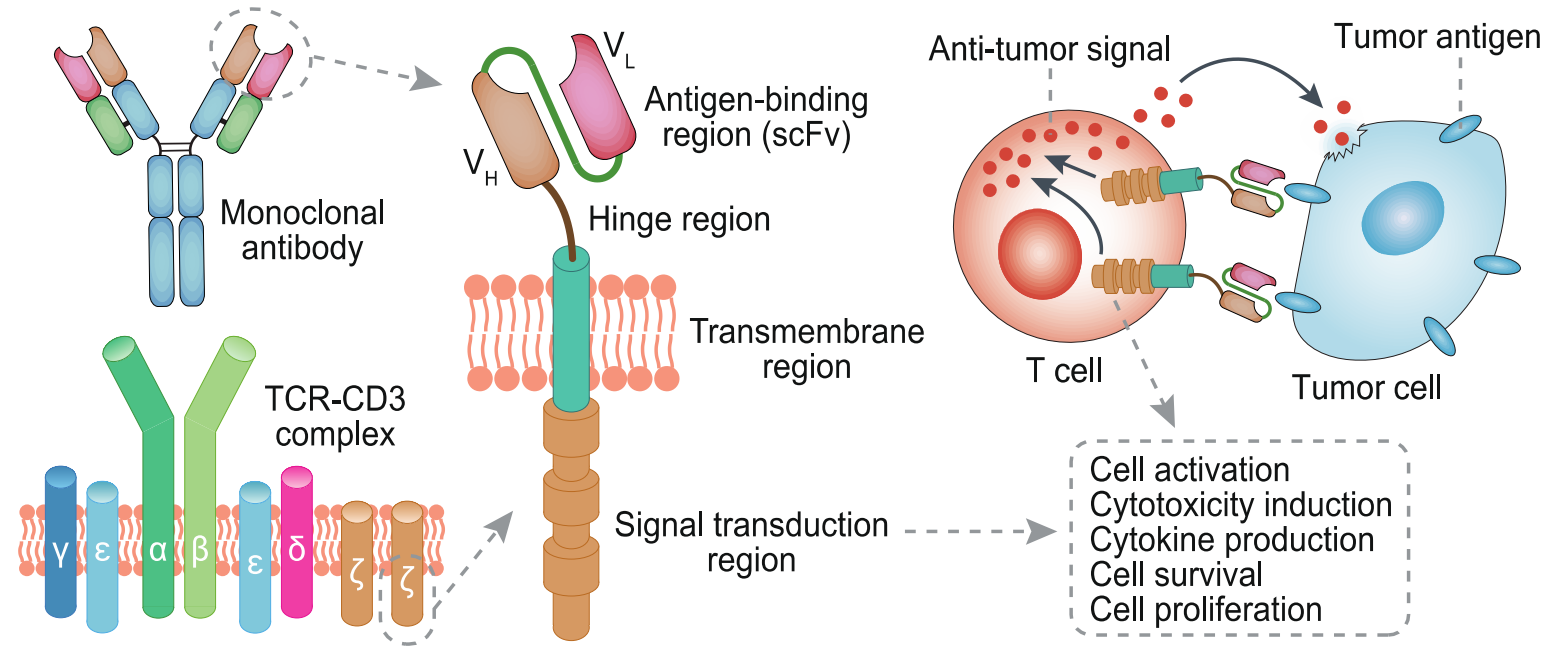


- ① Reconnaissance complexe Ag/peptide
 - + ② Co-stimulation
 - + ③ Signal cytokinique
- } = activation/ prolifération des Lymphocytes conventionnels



Larson, Nat Rev Cancer, 2021

Structure du CAR-T



LyT polyclonaux transduis par le CAR

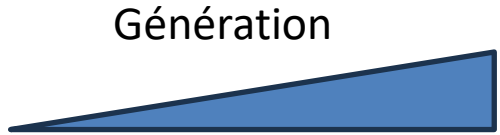
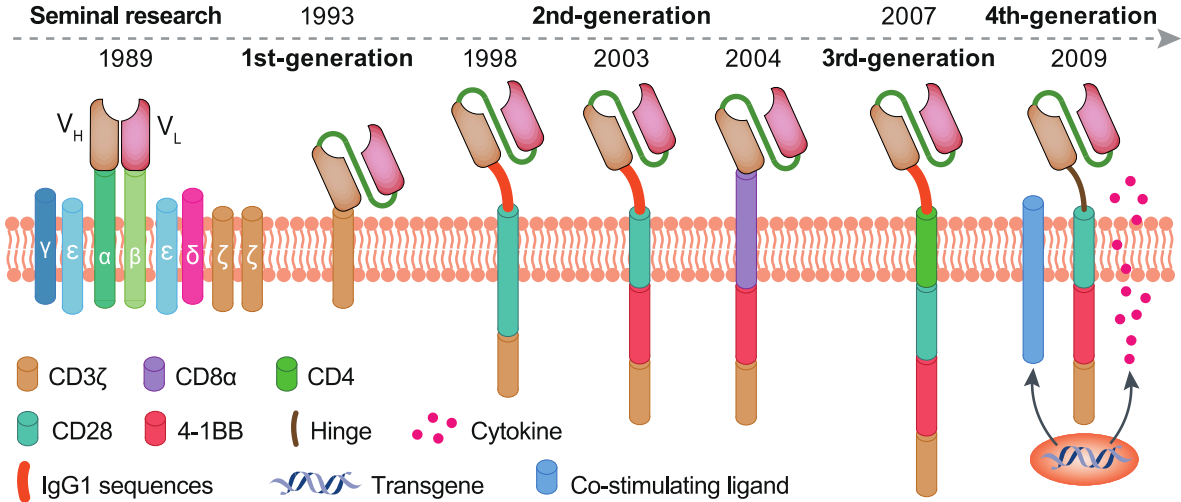
-single chain Fraction Variable (scFV)

-hinge (charnière)

-domaine de signalisation du TCR

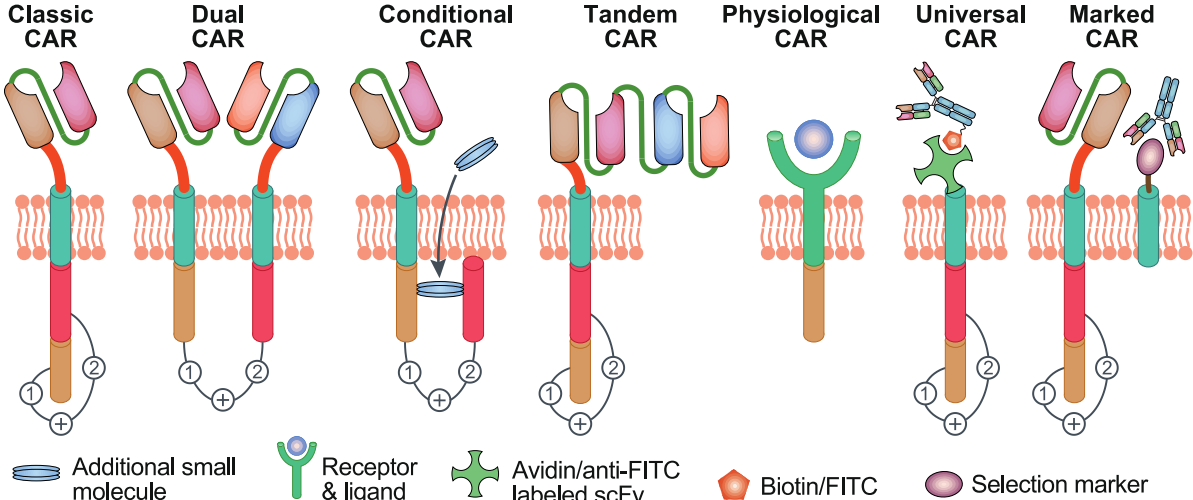
-récepteur de stimulation (CD28, 4-1BB, OX40)

Evolution des CAR-T



Cytotoxicité	+	+	+
Prolifération		+	+
Persistence			+

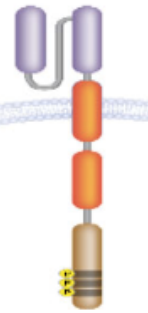
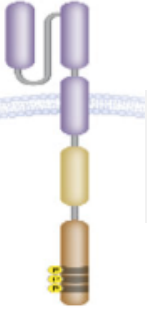
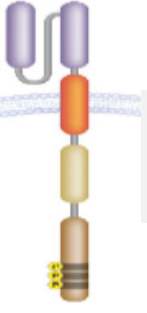
3 New CAR Models and Concepts



Nouvelles cibles++
BCMA

DLBCL : Lymphome Diffus à Grandes Cellules B

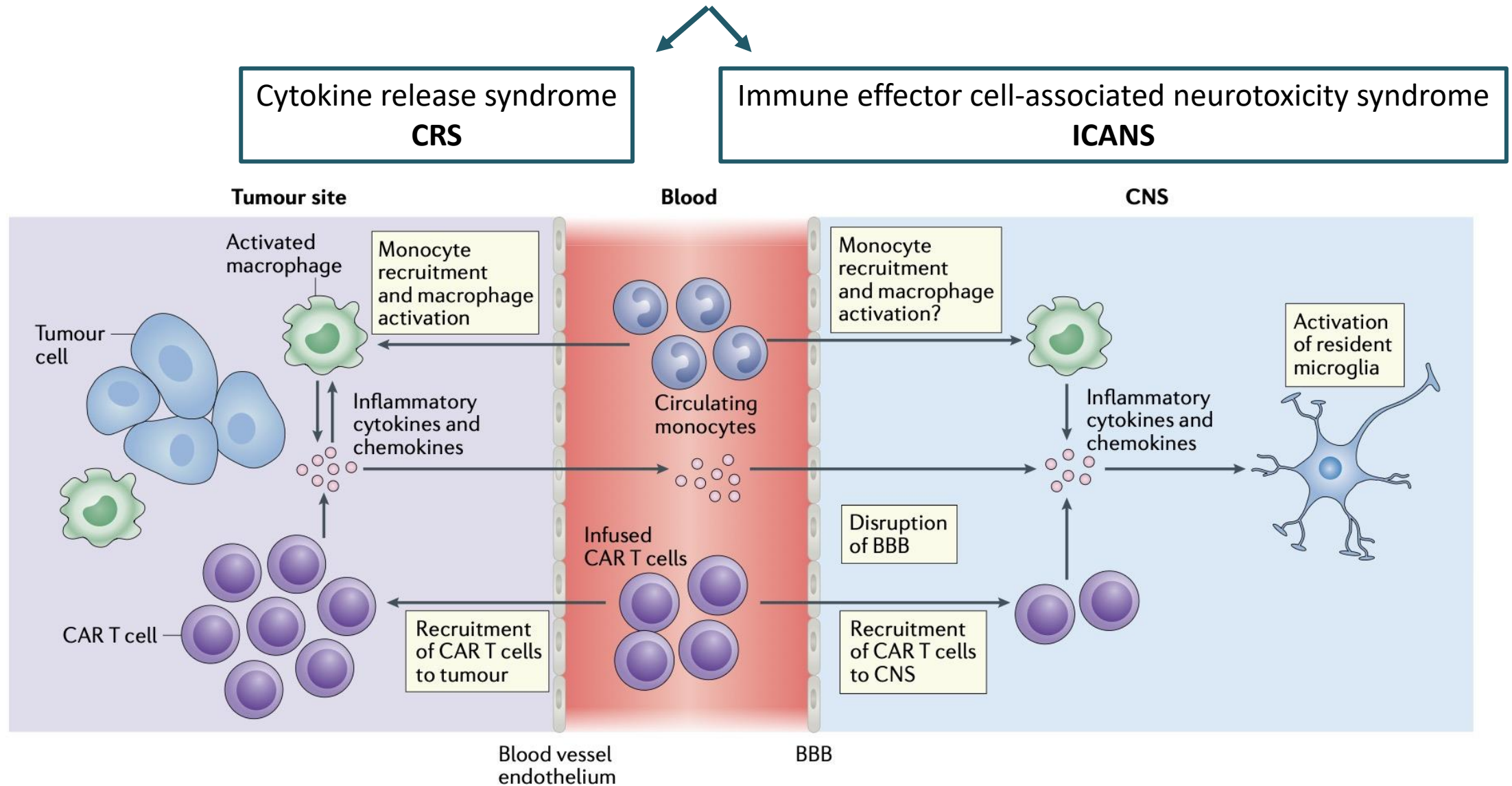
Différents types de CAR-T utilisés (2^{ème} génération)

	Axicabtagene ciloleucel (Axi-cel)	Tisagenlecleucel (Tisa-cel)	Lisocabtagène maraleucel (Liso-cel)
Cible	 CD19	 CD19	 CD19
Domaine de costimulation	CD28	4-1BB	4-1BB
Domaine de signalisation	CD3ζ	CD3ζ	CD3ζ
Taux de CRS (dont sévère)¹	92% (9%)	58% (21%)	42% (2%)
Taux d'ICANS (dont sévère)¹	67% (31%)	21% (8%)	30% (10%)
Taux de réponse globale (dont réponse complète)^{2, 3}	80% (60%)	66% (42%)	73% (53%)

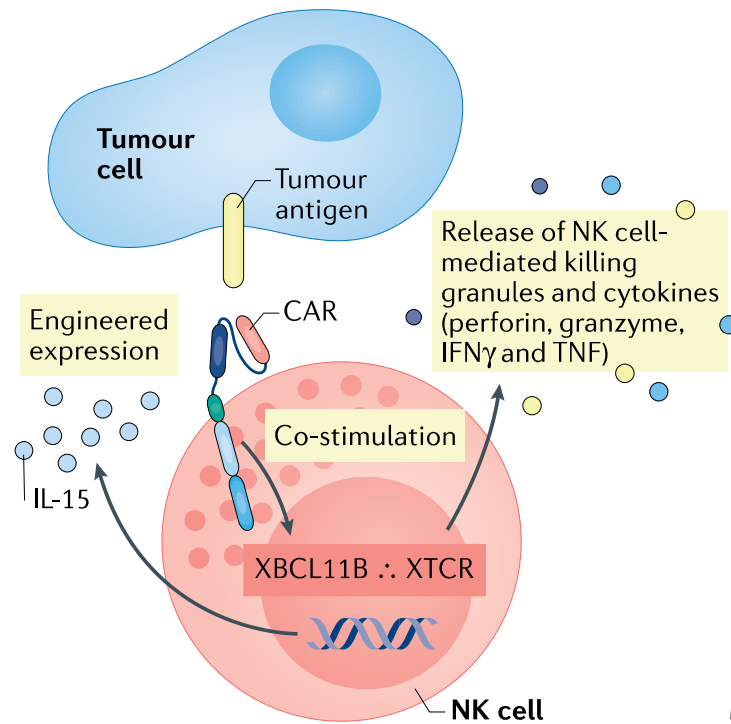
Sd de relargage des cytokines (CRS: Cytokine Release Syndrome)
Neurotoxicité (ICANS: Immune effector Cell Associated Neurotoxicity Syndrome)

1. Meng J et al., *Front Oncol*, 2021
2. Abramson JS et al., *The Lancet*, 2020
3. Bachy E. et al., *Nat Med*, 2022

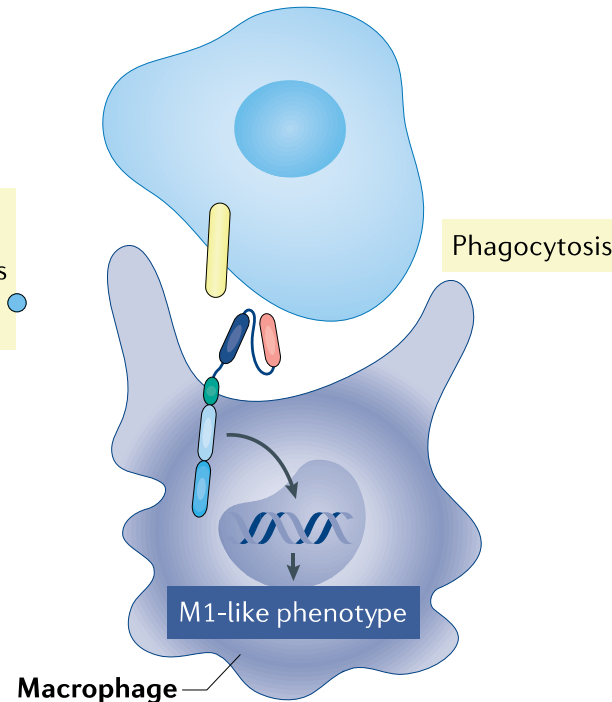
CAR T- cells and bispecific Abs : Acute toxicity



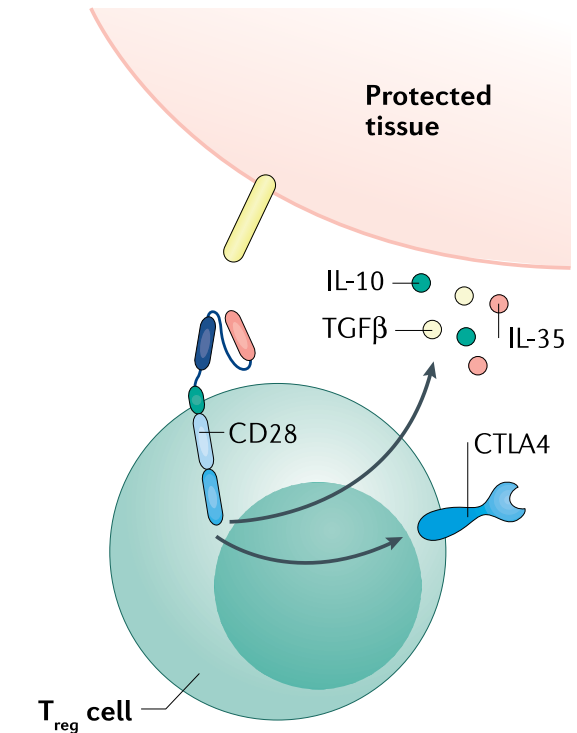
CAR-T non conventionnels



- CAR-NK cells**
- Promising allogenic product with less GvHD
 - Sufficient expansion with cord blood starting product
 - Engineered ectopic IL-15 expression increases expansion and efficacy
 - Require co-stimulation for significant efficacy

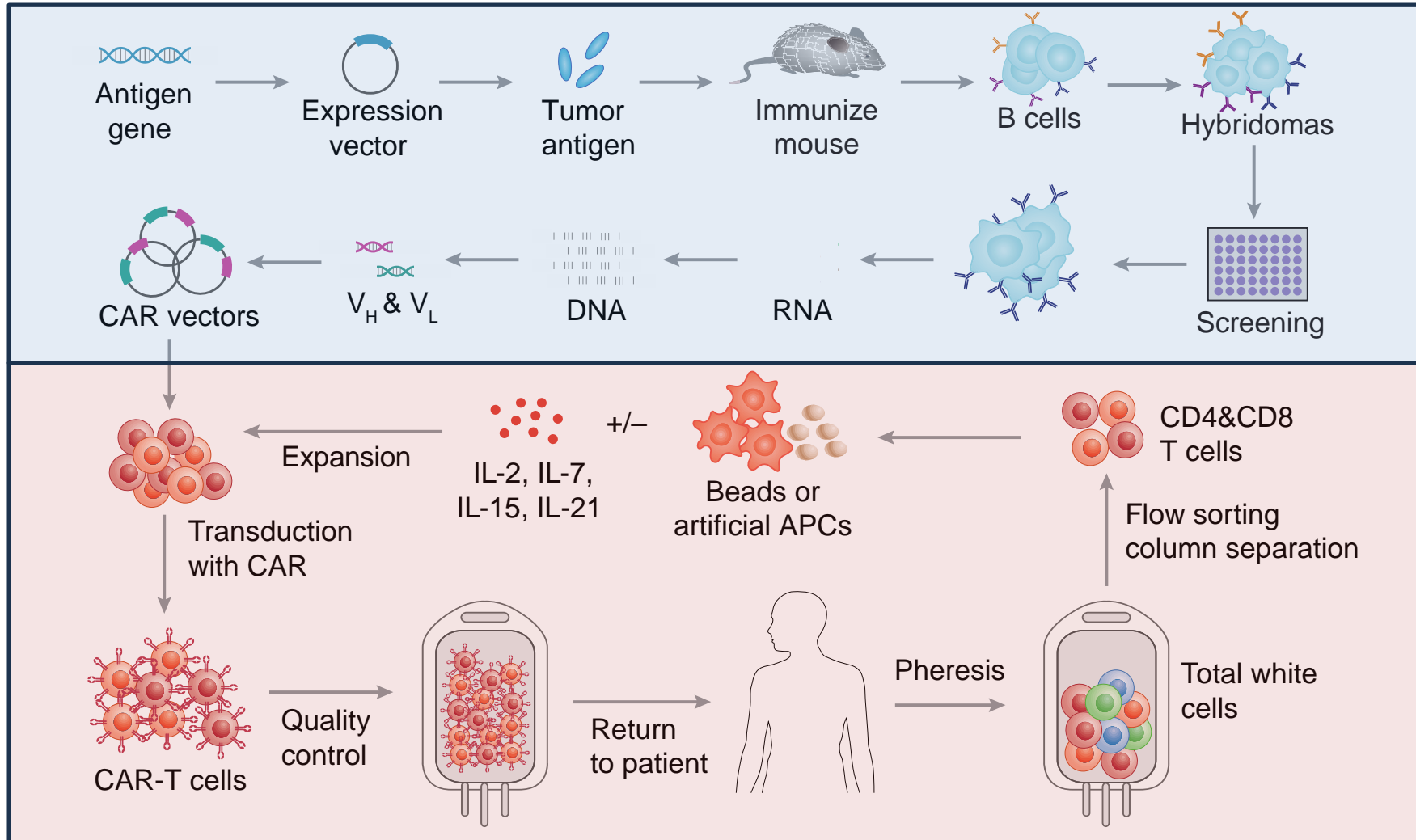


- CAR-Ms**
- CAR-induced phagocytosis of antigen-positive tumour cell
 - CAR signalling results in a pro-inflammatory M1-like phenotype
 - Able to cross-present and activate T cells

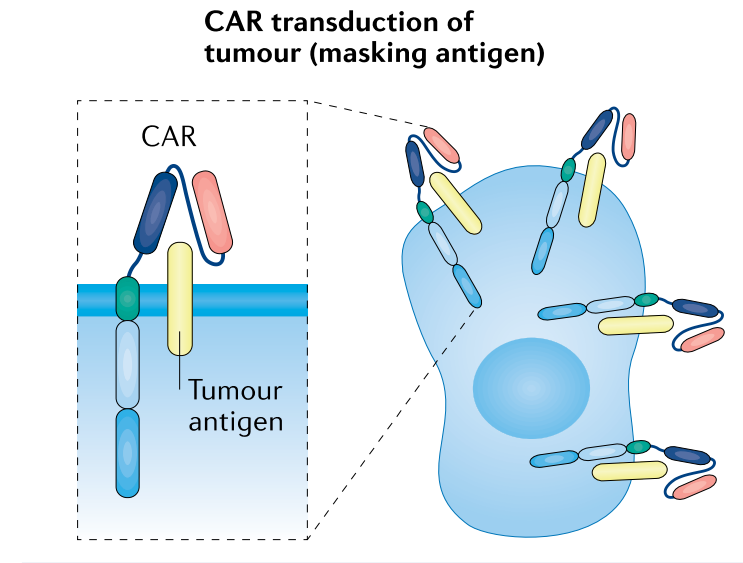
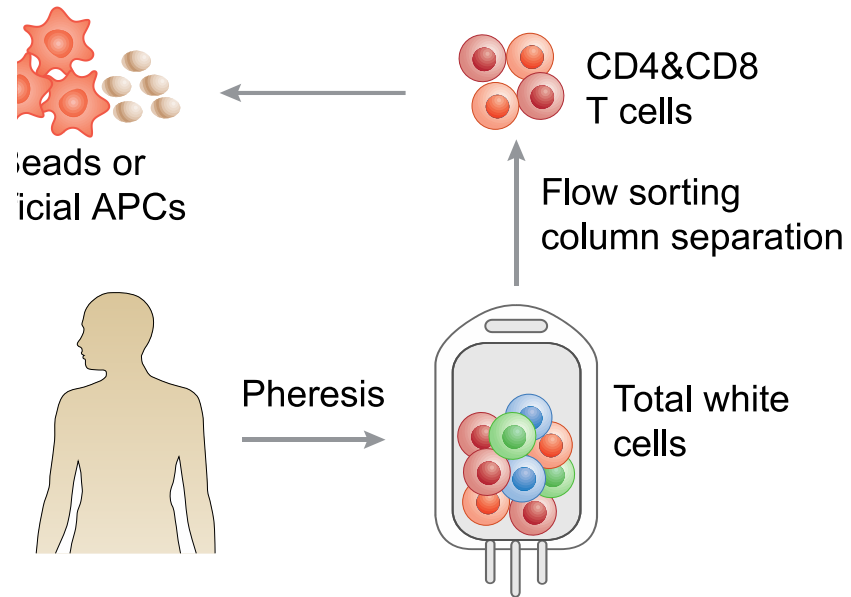


- CAR T_{reg} cells**
- Protect tissues in an antigen-dependent manner
 - Secrete immunosuppressive cytokines (TGF β , IL-10, IL-35)
 - Limit local T effector cell activation through expression of molecules such as CTLA4 to outcompete for co-stimulation

Production de CAR T



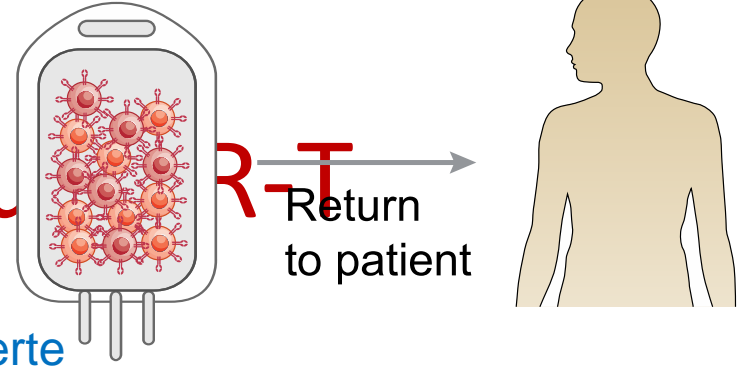
Limites d'efficacité du CAR-T



persistance et l'expansion des CAR-T
dépend du phénotype des lymphocytes
avant apherèse
exhausted, peu proliférant -> mauvaise
expansion

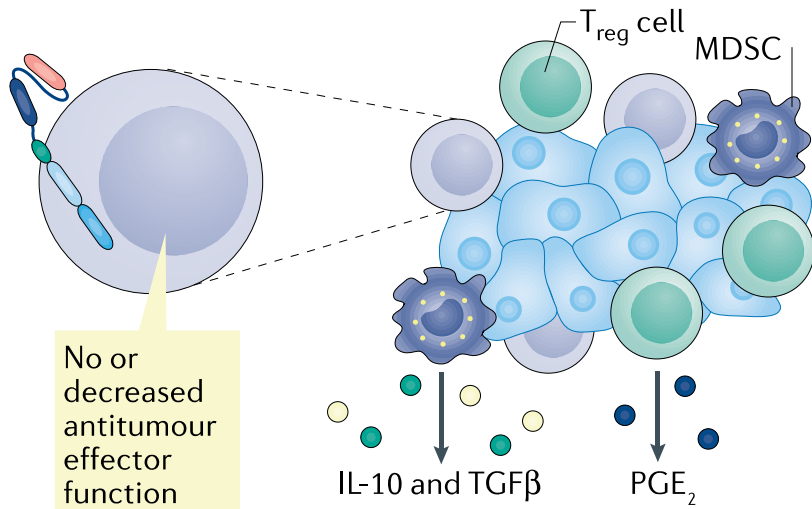
Contamination par cellules tumorales

Limites d'efficacité du CAR-T



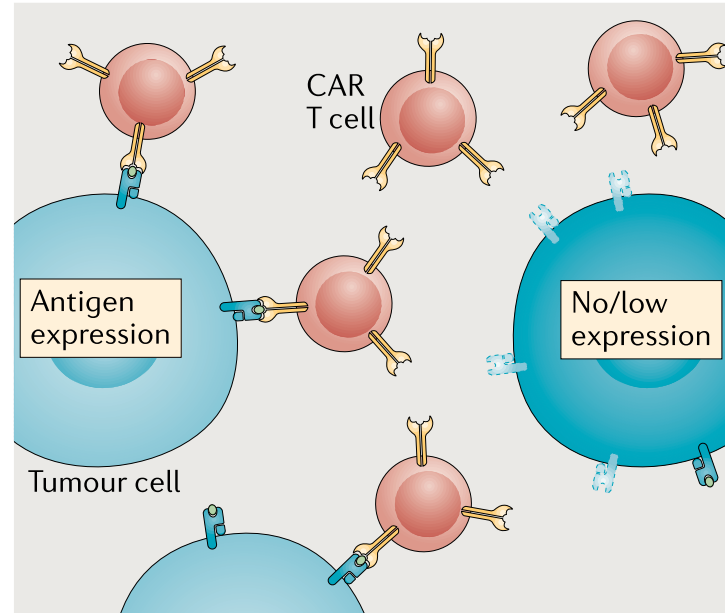
composition de l'environnement tumora (Treg, MDSC)

Immunosuppressive tumour microenvironment

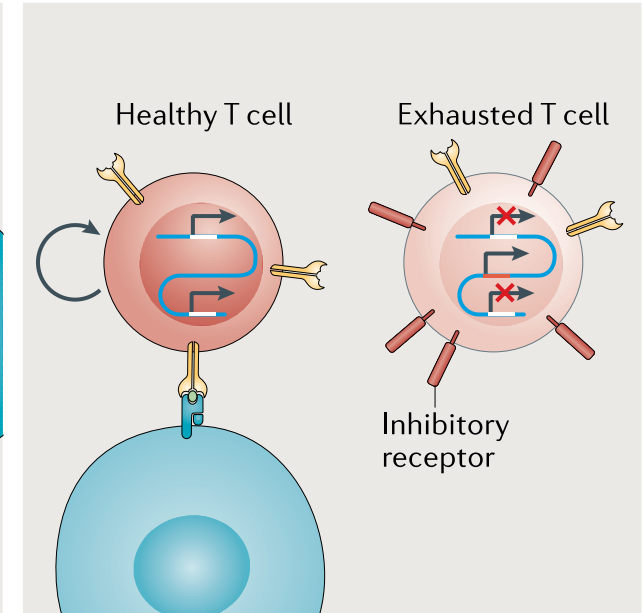


hétérogénéité tumorale/perte d'expression de l'antigène

a Antigen escape



b T cell exhaustion



dysfonction des CAR-T:

anergie, exhaustion (épuisement), sénescence
peu de prolifération

expression de récepteur inhibiteurs (PD-1, TIM3, LAG3, TIGIT)

Intérêt du suivi biologique des CAR-T

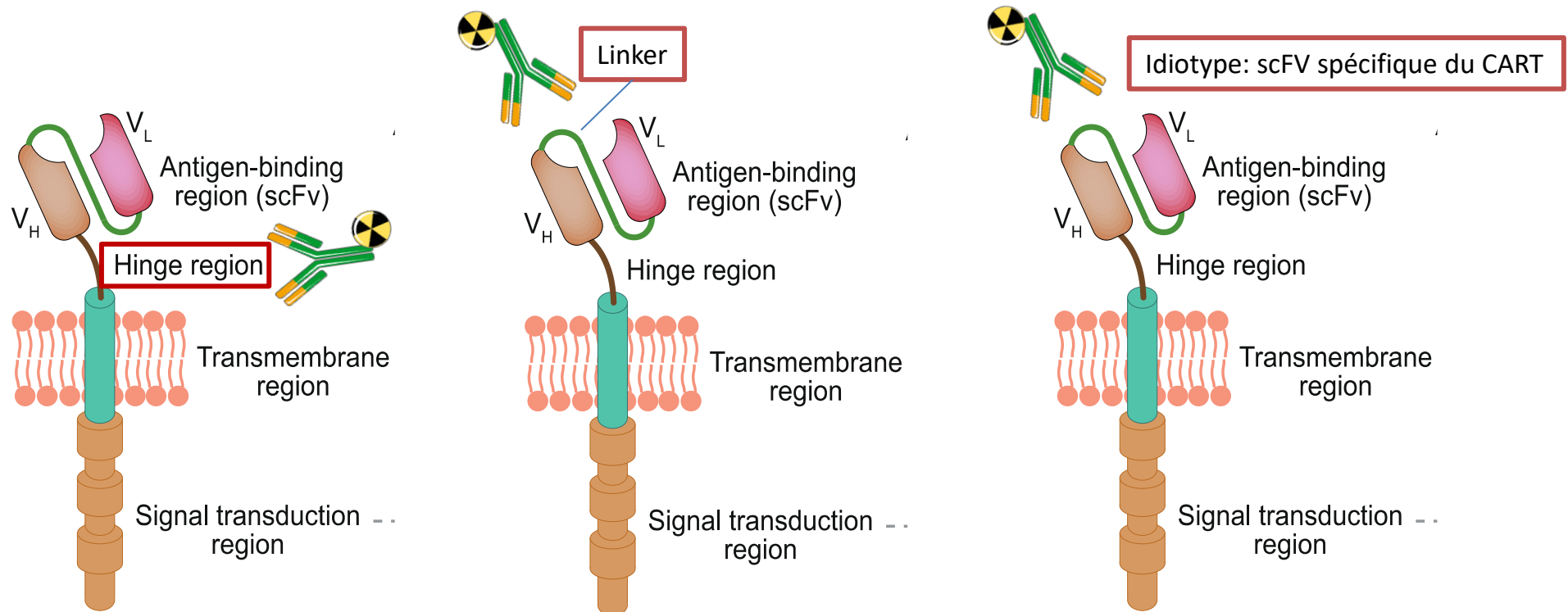
- 1) Facteurs prédictifs de réponse
 - Nature de la maladie (expression antigénique, masse tumorale, capacité de migrer vers la tumeur)
 - Qualité des cellules immunes lors de l'aphérèse
 - Qualité du produit injecté
 - Amplitude d'expansion et persistance du CAR-T après infusion
 - Rapport cellules effectrices/cellules cibles
 - CAR-T
 - Aplasie B
- 2) Facteurs prédictifs de complications
 - Sd de relargage des cytokines (CRS: Cytokine Release Syndrome)
 - Neurotoxicité (ICANS: Immune effector Cell Associated Neurotoxicity Syndrome)
 - Infections -> reconstitution immunitaire?
- 3) Exploratoire → recherche translationnelle

Approches de suivi du CAR-T

	Cytométrie de flux Cytométrie de masse	qPCR digital PCR	Dosages cytokiniques	Histologie
Avantages	Quantification du CAR-T rapide Sous types cellulaires (aplasie B); cellules immunitaires (reconstruction); TME	Sensibilité++	NA	Localisation spatiale
Inconvénients	maladie résiduelle, perte de l'antigène qualité du produit d'aphérèse et de réinjection	Pas d'accès aux autres cellules Localisation dans la cellules?	NA	Tissus

Quantification du CAR-T: anticorps

Direct



“universel”

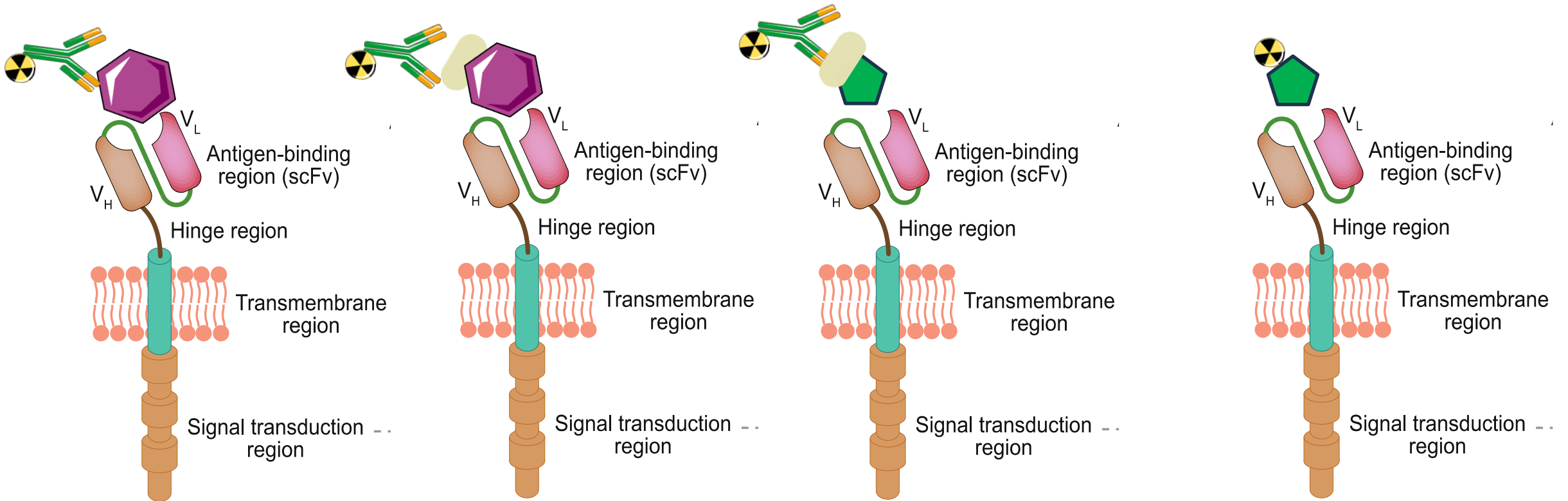
“universel”

spécifique

Quantification du CAR-T: antigène : fonctionnalité

Indirect

Direct



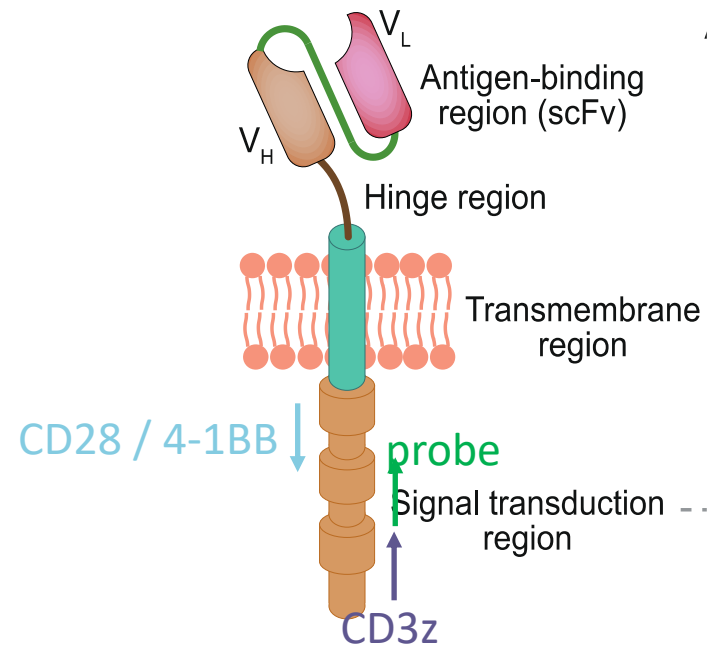
 protéine cible recombinante

 biotine



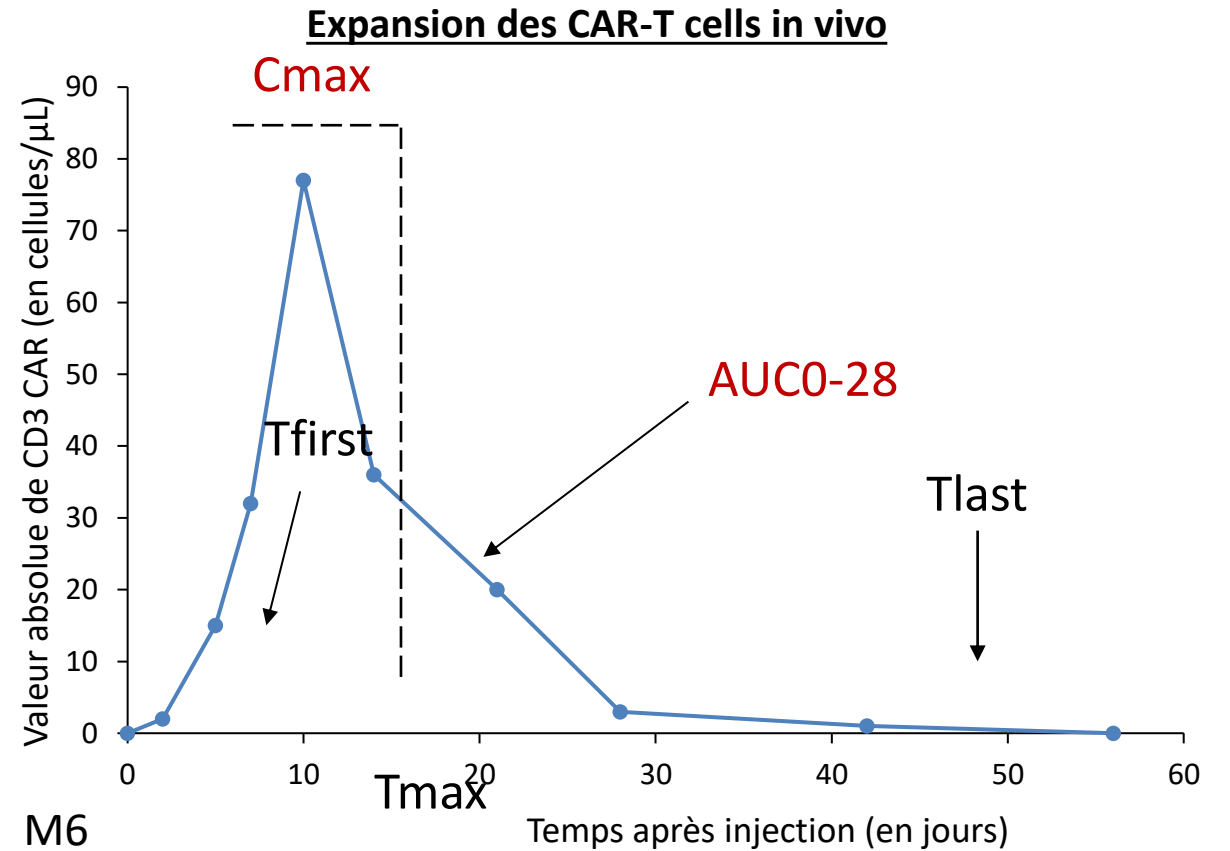
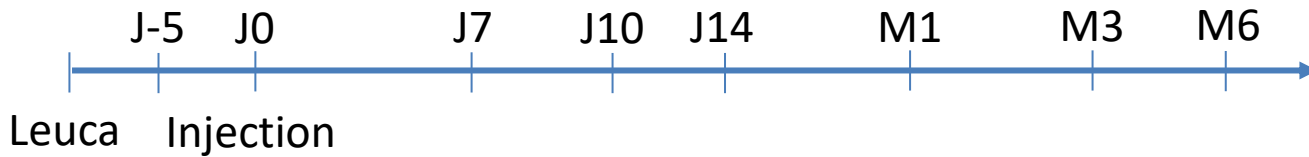
protéine cible recombinante
+ REAfinity mutated Fc backbone (Miltenyi)
+ FC IgG2a -> Stabilisation
de dimère (BD)

Quantification du CAR-T: dPCR

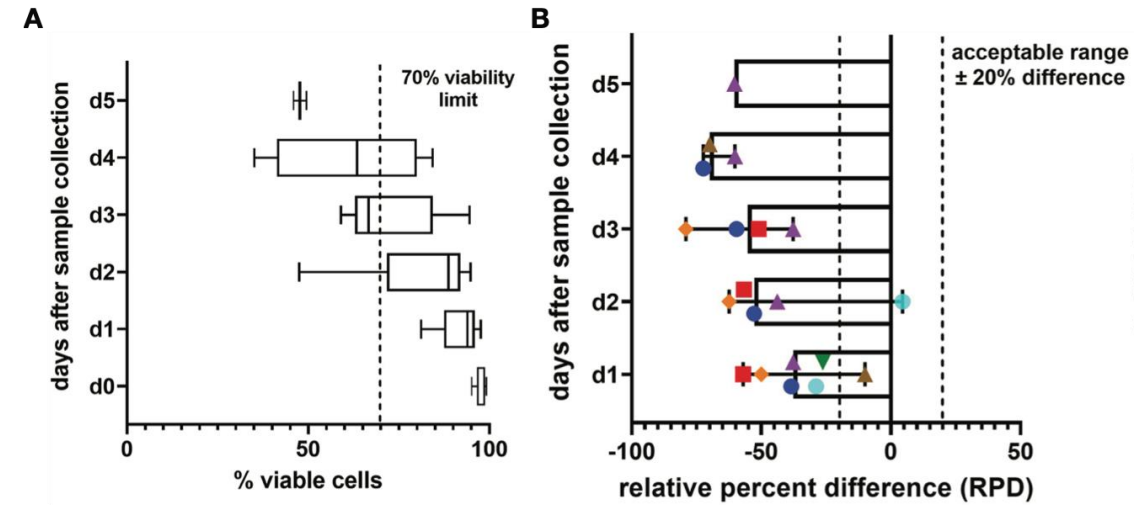
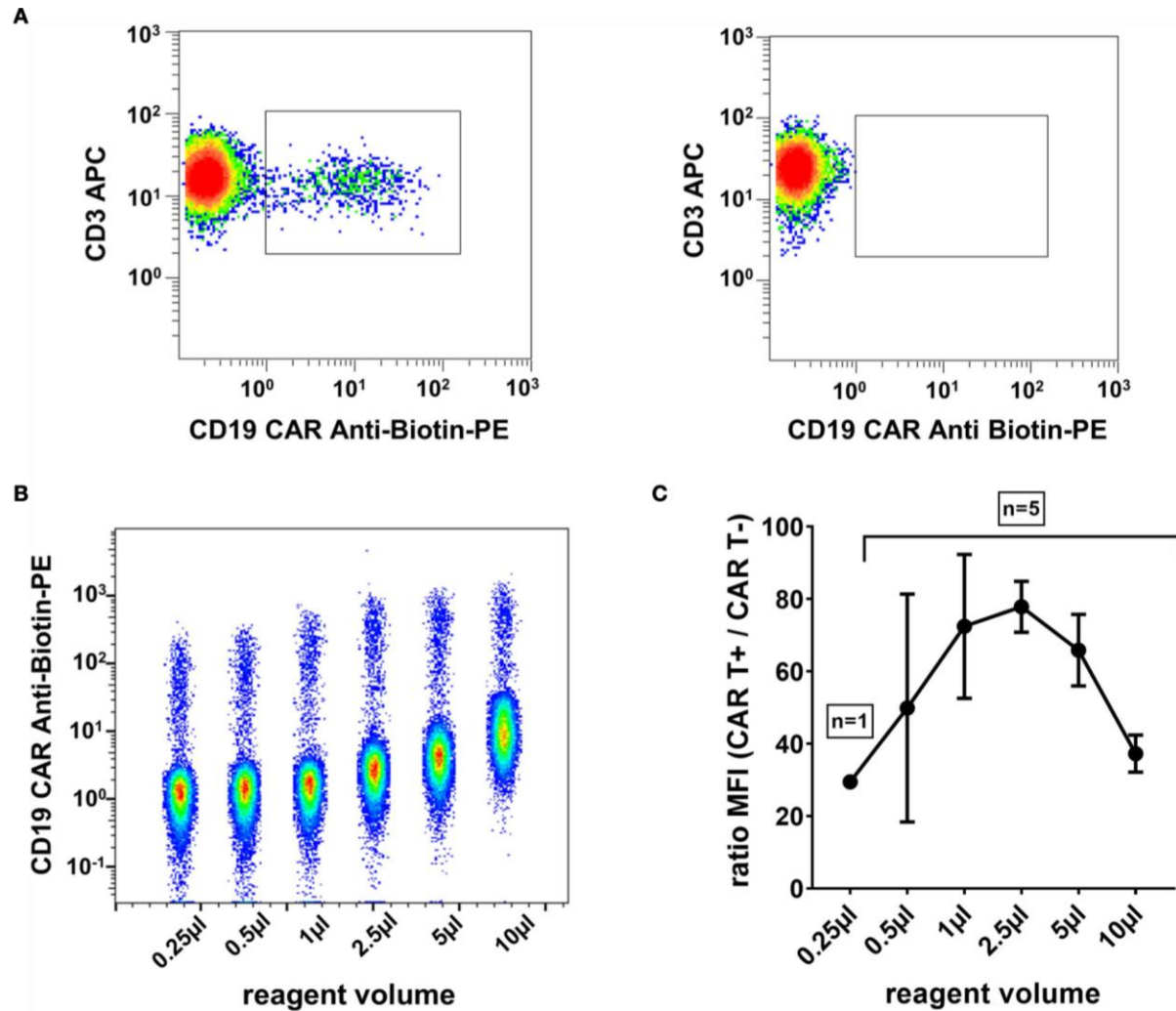


**qPCR ou dPCR
sur ADN**

- **CMF** : Cytométrie de flux
- ✓ Facilité d'accès
- ✓ Rapidité
- ✓ Informations sur les autres cellules :
aplasie B + cellules immunitaires
- ✓ Différents points cinétiques :



Préanalytique



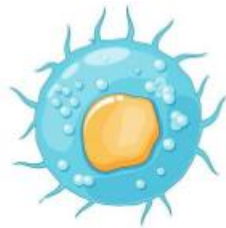
Anticoagulant: EDTA vs Heparine

Expérience au CHU de Rennes (-> Mars 2020)

Tube 15 couleurs



Lymphocytes B :
CD20



Lymphocytes NK :
CD16, CD56



Lymphocytes T :
CD3
CD4
CD8



T régulateurs :
CD127
CD25

+ CD45RA, CCR7 : naïfs, mémoires centraux, effecteurs mémoires et mémoires terminaux (EMRA)

+ Immune checkpoint : PD1, TIM3, LAG3, CD95

+ Détection des CAR-T : CD19, biotine → 117 variables

Cytomètre BD-LSRFortessa™

→ **117 variables, c'est vraiment utile ?** Thèse de Pharmacie, Dr Anne-Sophie Villoteau

- **Etude monocentrique rétrospective** au CHU de Rennes
- Données issues de sang anticoagulé par EDTA de patients DLBCL (r/r) traités par CAR-T

Objectif principal : Comparer les populations lymphoïdes T circulantes entre patients DLBCL répondeurs et non répondeurs à un traitement par CAR-T

Population étudiée

Critère d'inclusion :

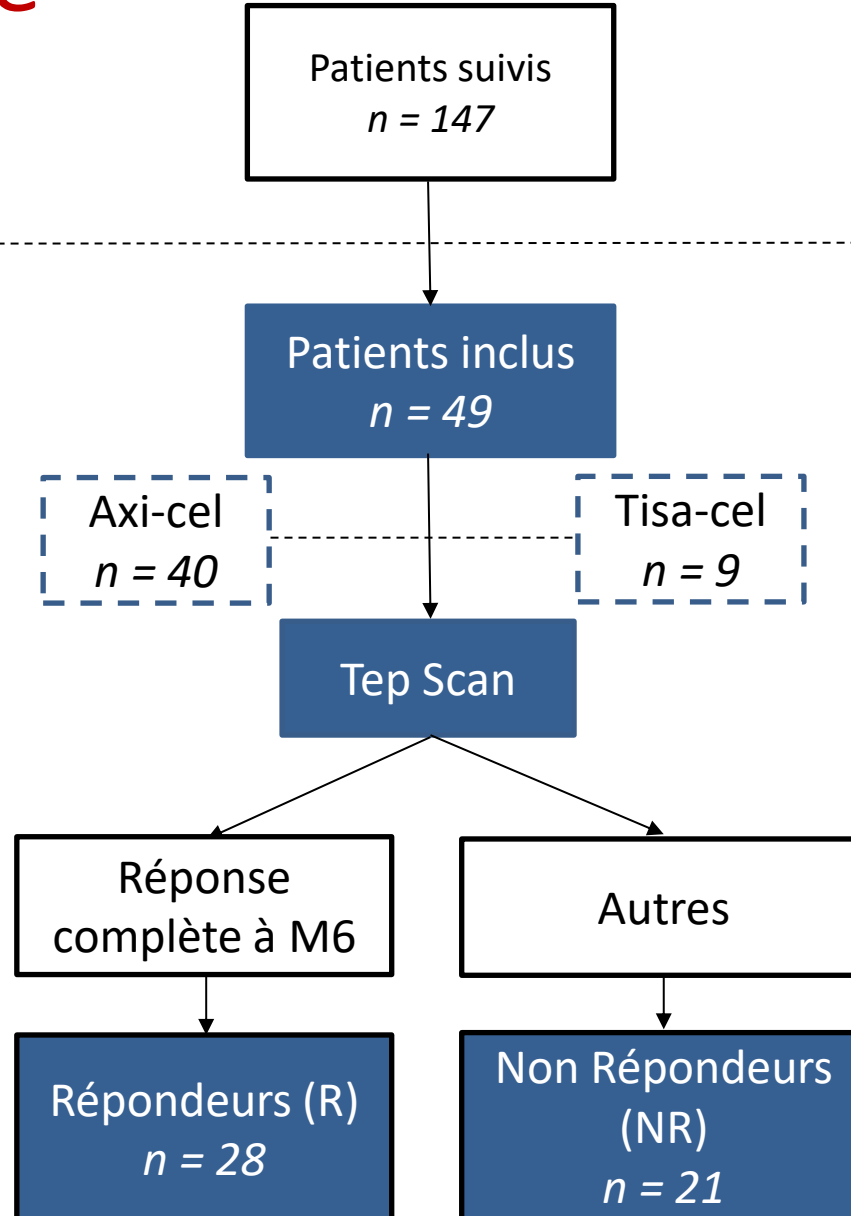
- Patient atteint d'un DLBCL (r/r)
- Traité par tisa-cel ou axi-cel

Critères d'exclusion :

Si absence d'un point de suivi :

- 1 point précoce (leucaphérèse, J-5)
- J0 avant injection,
- J7 ou J10
- 1 point tardif (M1, M3, M6, M12)

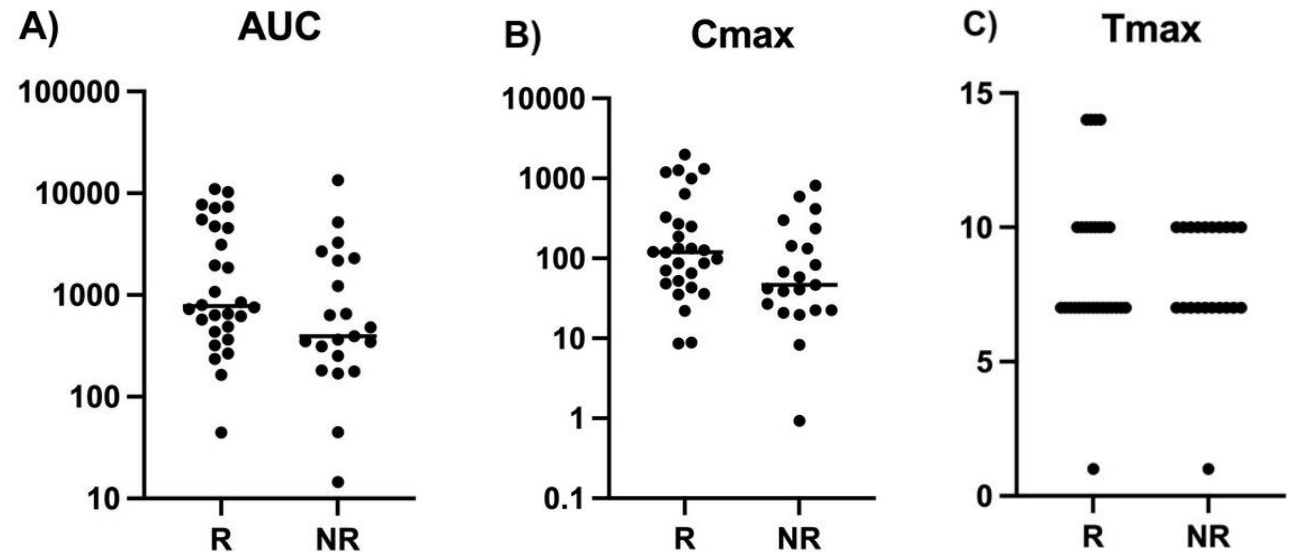
Période d'inclusion : mars 2021 à décembre 2022



Changement de pratique :
→ Prélèvement sur héparine
→ Stabilité > 24h

Comparaison des paramètres d'expansion

Paramètre	AUC	Cmax	Tmax
pvalue	0,0879	0,0703	0,8320

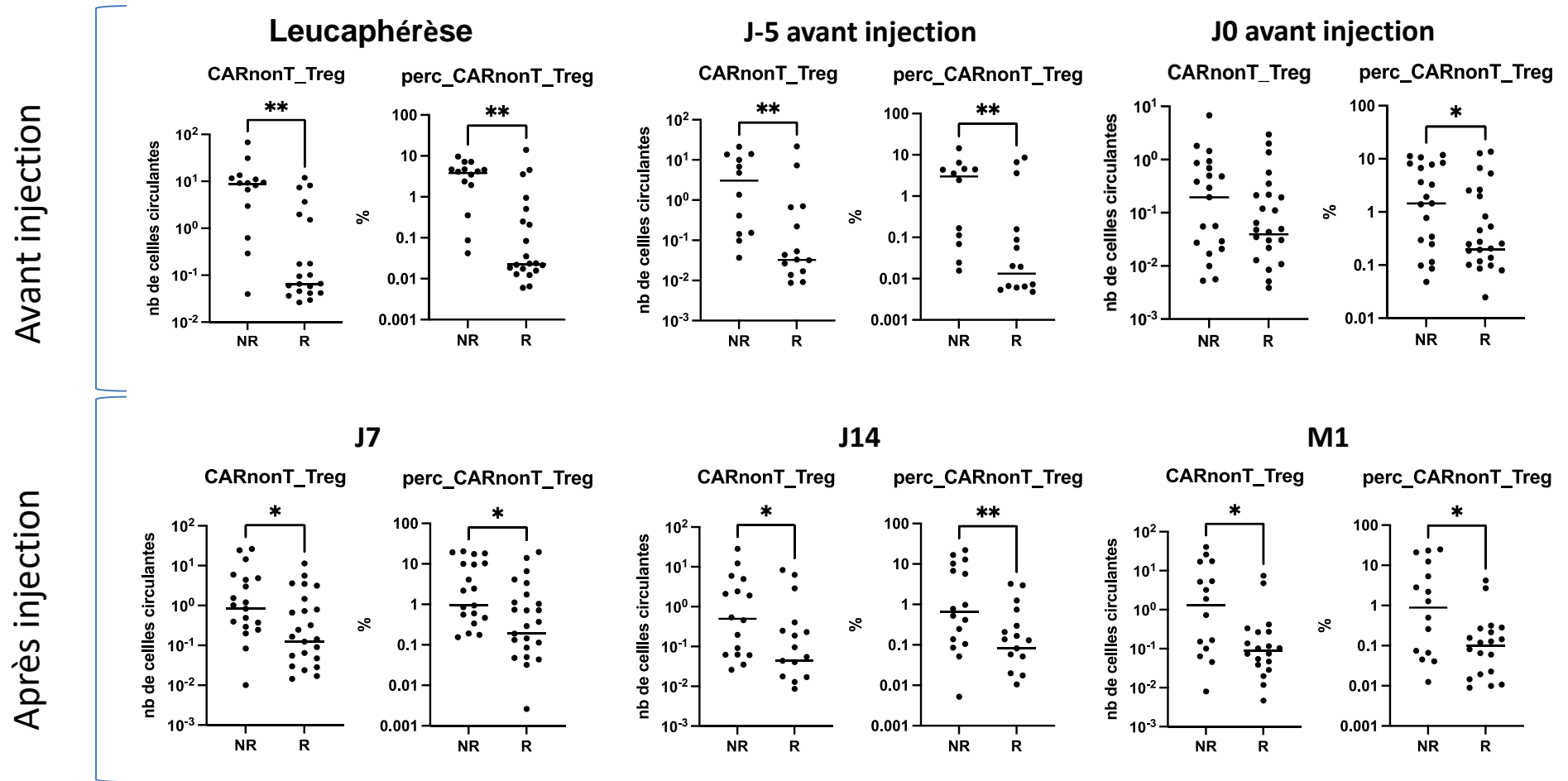


→ AUC et Cmax se rapprochent de la significativité et semblent élevées chez les répondeurs

→ Deux sous-groupes de réponse

Lymphocytes T NON CART (quantification)

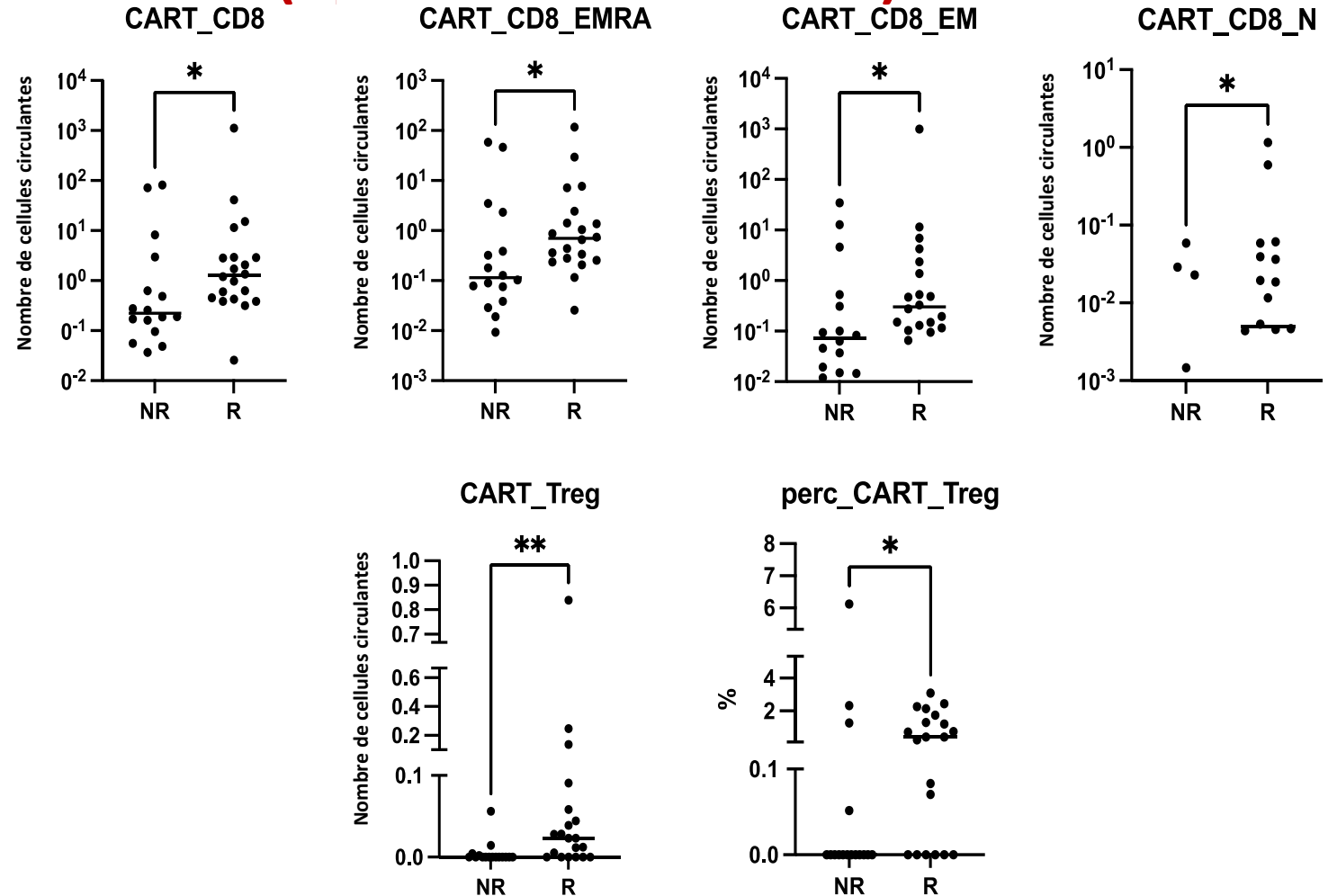
	Treg	Perc T reg
Leuca	0,01	0,01
J-5	0,01	0,01
J0	0,12	0,04
J7	0,03	0,02
J10	0,00	0,01
J14	0,02	0,01
M1	0,04	0,04
M3	0,13	0,04
M6	0,59	0,71



→ Proportion plus importante des lymphocytes T régulateurs chez les non répondeurs avant et après traitement

Lymphocytes CART (quantification)

	CD8 EM	CD8 EMRA	CD8 N	Treg
J7	0,11	0,17	0,31	0,90
J10	0,19	0,57	0,99	0,99
J14	0,29	0,42	0,46	0,87
M1	0,04	0,03	0,02	0,00
M3	0,68	0,70	0,72	0,47
M6	0,93	0,59	0,34	0,25



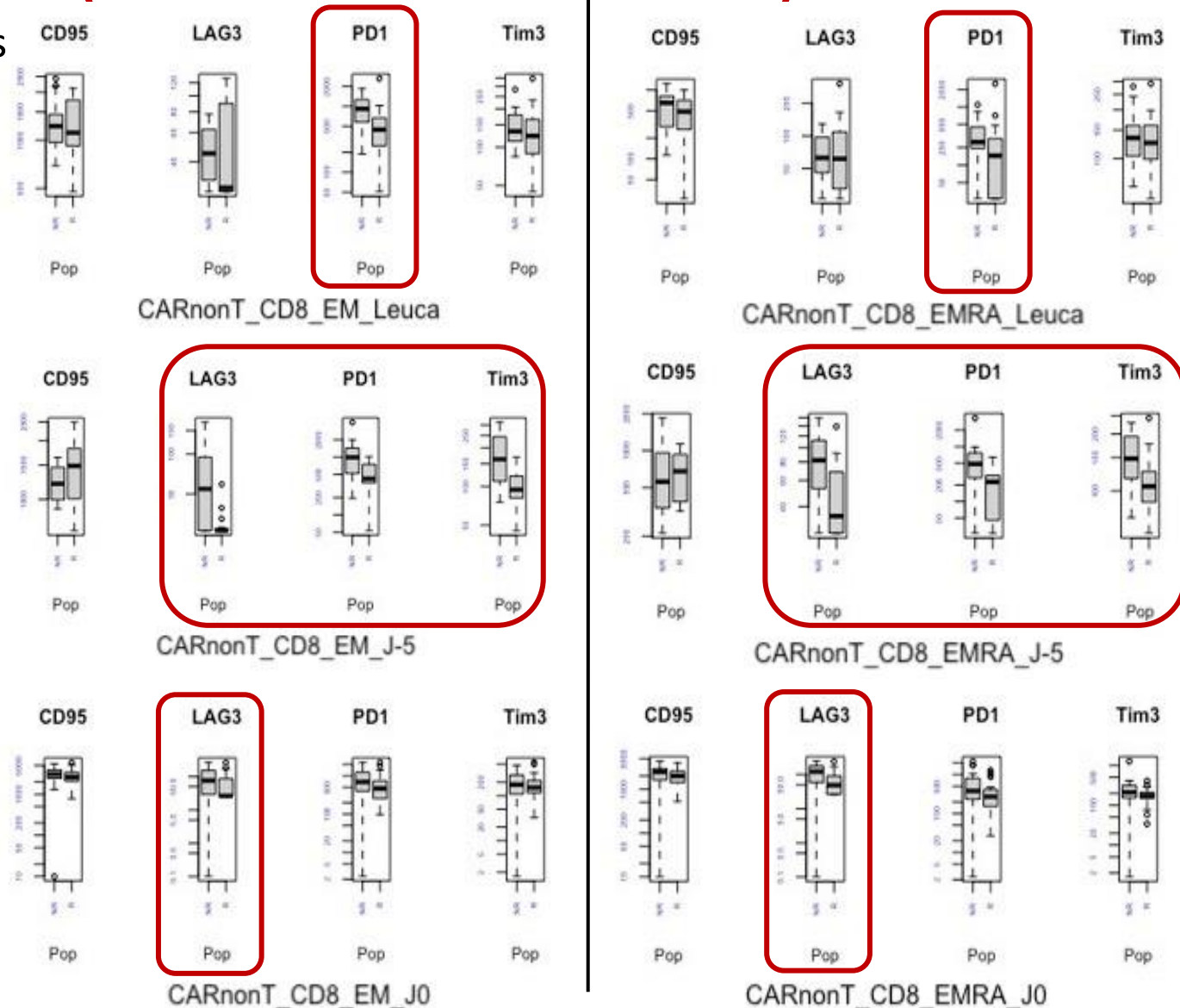
→ ↑ des lymphocytes **T CD8 effecteurs** (EM et EMRA), **naïfs et T régulateurs** chez les répondeurs

Lymphocytes T NON CART (MFI: fonctionnalité)

a) Niveau d'épuisement des cellules lymphocytaires T non CAR avant injection :

Population lymphocytaire	Temps	CD95	LAG3	PD1	Tim3
CARnonT_CD8_EM	Leuca	0,62	0,54	0,01	0,23
CARnonT_CD8_EMRA		0,51	0,76	0,03	0,66
CARnonT_CD8_EM	J-5	0,35	0,03	0,02	0,01
CARnonT_CD8_EMRA		0,76	0,03	0,01	0,05
CARnonT_CD8_EM	J0	0,17	0,03	0,09	0,59
CARnonT_CD8_EMRA		0,19	0,00	0,13	0,11

→ Lymphocytes T CD8 effecteurs apparaissent plus épuisés chez les non répondeurs avant injection



Lymphocytes CART (MFI: fonctionnalité)

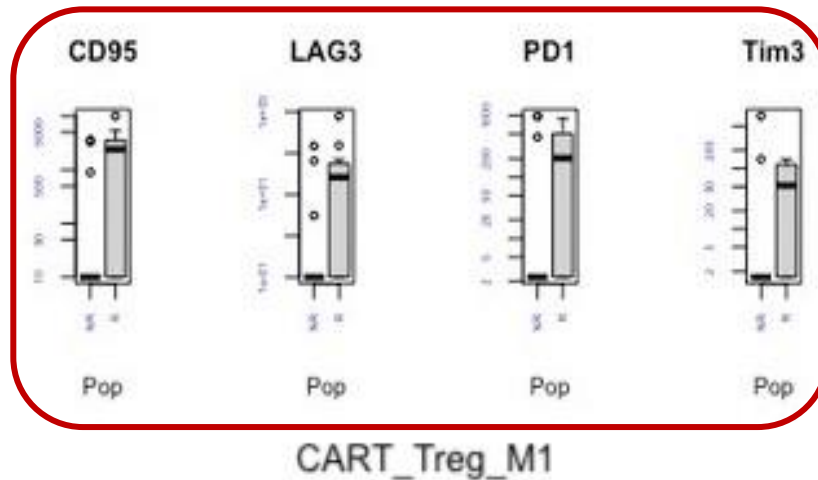
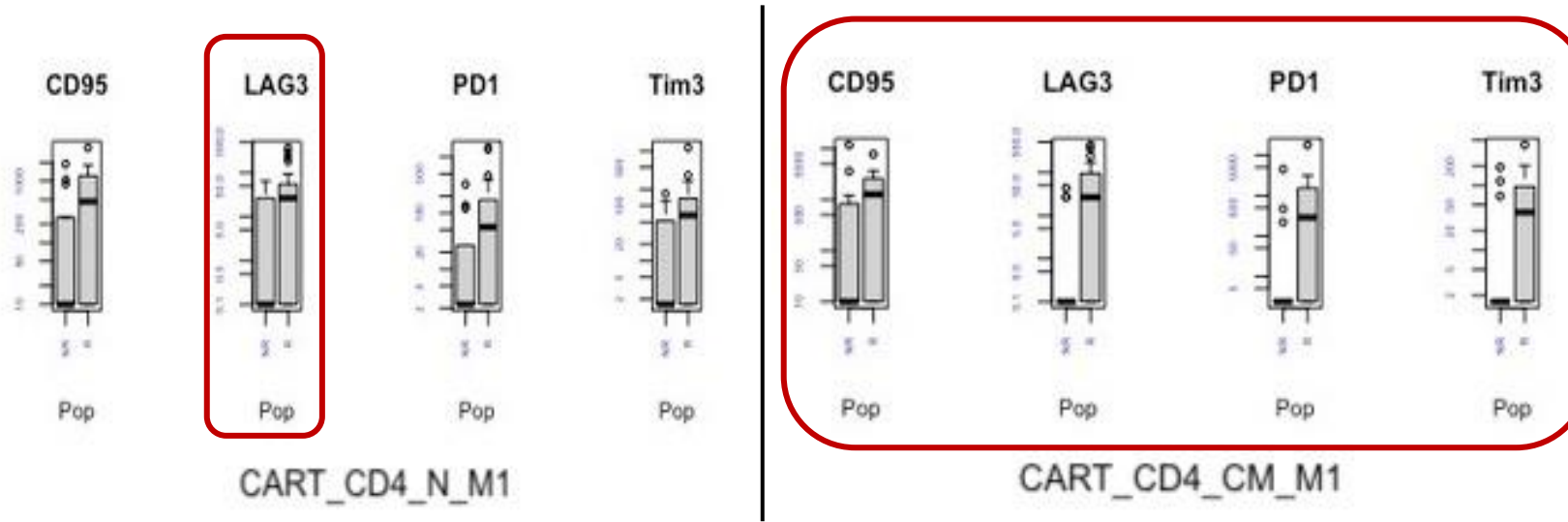
b) Niveau d'épuisement des cellules lymphocytaires T CAR :

Population lymphocytaire	Temps	CD95	LAG3	PD1	Tim3
CART_CD4_CM	M1	0,03	0,02	0,01	0,03
CART_CD4_EM		0,02	0,07	0,91	0,76
CART_CD4_EMRA		0,91	0,08	0,27	0,56
CART_CD4_N		0,14	0,04	0,27	0,05
CART_CD8_CM		0,56	0,14	0,91	0,47
CART_CD8_EM		0,65	0,23	0,48	0,06
CART_CD8_EMRA		0,84	0,71	0,83	0,64
CART_CD8_N		0,10	0,05	0,09	0,10
CART_Treg		0,01	0,02	0,05	0,01

→ Différence significative sur les populations CM, N, Treg

Lymphocytes CART (MFI: fonctionnalité)

b) Niveau d'épuisement des cellules lymphocytaires **T CAR** à 1 mois :



→ Les lymphocytes T CD4 CM, T régulateurs apparaissent plus épuisés à 1 mois après injection chez les répondeurs

Synthèse des résultats obtenus

Répondeurs	
Comparaison des sous-populations lymphocytaires T non CAR	↓ des lymphocytes T régulateurs avant et après traitement
Comparaison des sous-populations lymphocytaires T CAR	↑ des lymphocytes T CD8 effecteurs (EM et EMRA), naïfs et T régulateurs à 1 mois
Comparaison des MFI des sous-populations lymphocytaires T non CAR	↓ épuisement des lymphocytes T CD8 effecteurs avant injection
Comparaison des MFI des sous-populations lymphocytaires T CAR	↑ épuisement des lymphocytes T CD4 CM, T régulateurs

UNITC, 1^{ER} CONSORTIUM NATIONAL DE RECHERCHE SUR LES THÉRAPIES CELLULAIRES ET GÉNIQUES EN CANCÉROLOGIE

Labellisé par l'INCa et créé en 2024, UNITC réunit tous les acteurs de l'écosystème français des thérapies cellulaires et géniques en cancérologie. UNITC favorise la complémentarité, la transversalité et les synergies pour relever les plus grands défis actuels de la recherche et de l'accès des thérapies innovantes aux patients.



Recherche translationnelle et biomonitoring

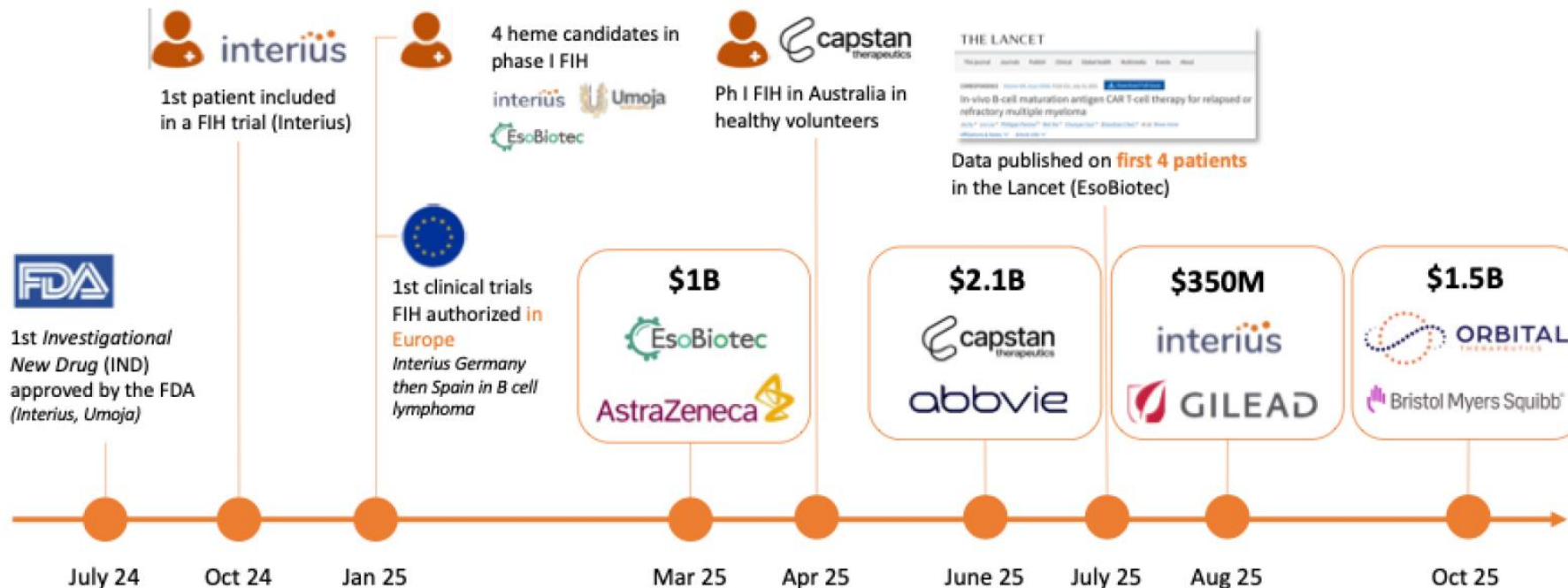
Sophie Caillat-Zucman, Karin Tarte et Vincent Allain

- › Mapping des laboratoires d'immuno-monitoring
- › Standardisation des résultats d'immuno-monitoring
- › Production de guidelines sur le monitoring des patients
- › Workshop annuel
- › Valorisation et soutien des équipes UNITC pour les appels à projets de recherche français et européens

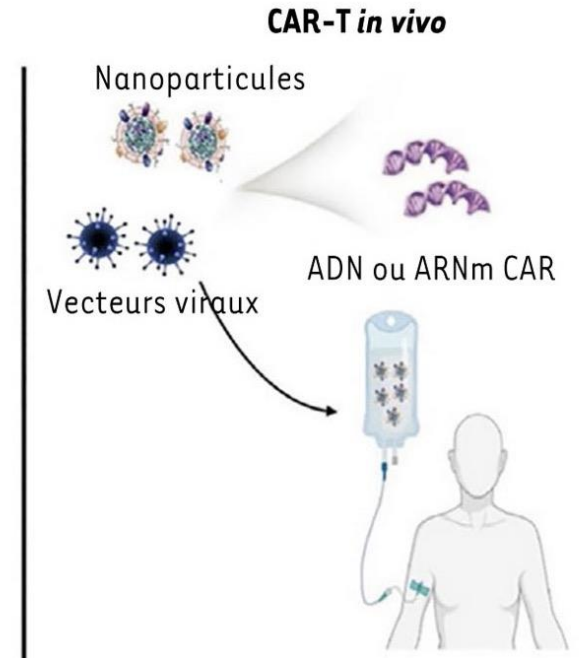
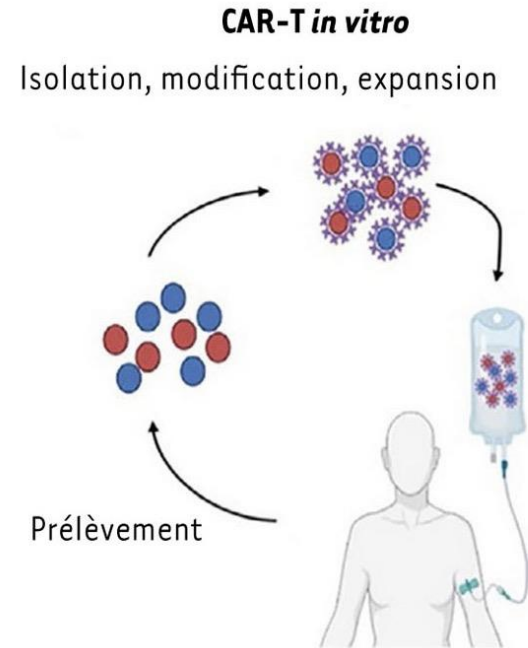
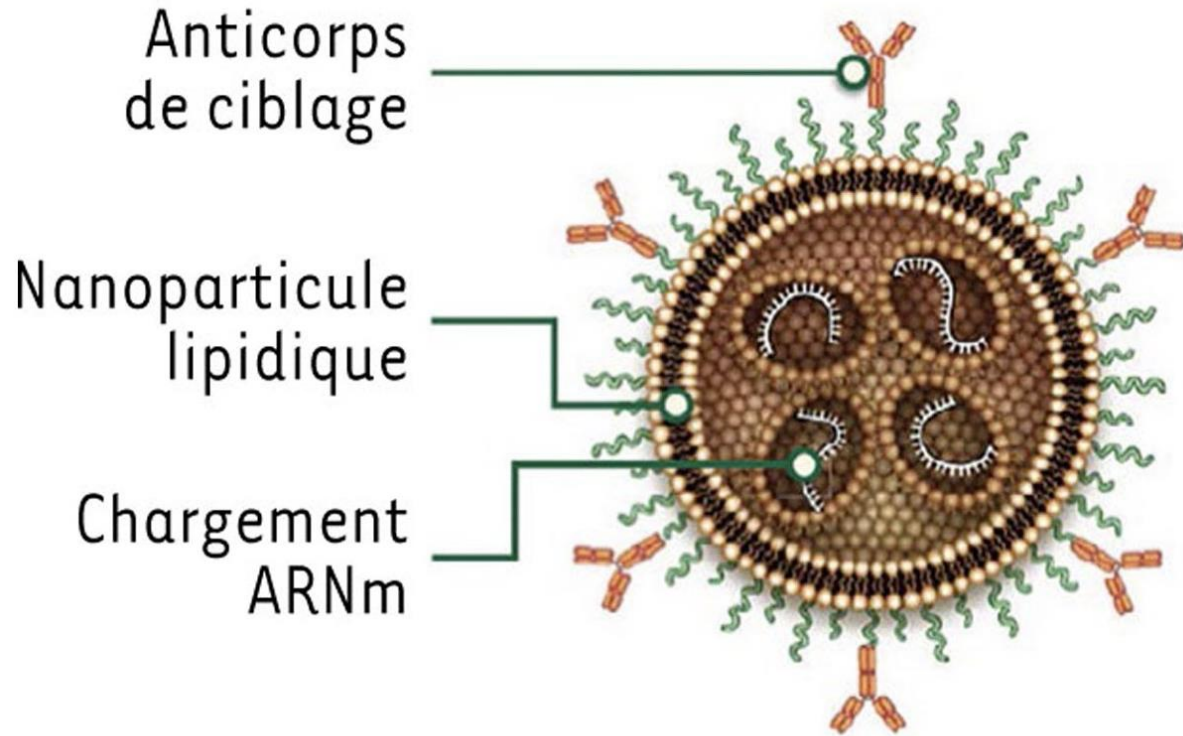


CAR in-vivo

- “off-the-shelf”, simplification du process
- Logistique, temps d’accessibilité, cout diminués
- Pas de conditionnement (lymphodepletion)



CAR in-vivo



Nanoparticule lipidique pour la production de CAR-T in vivo. La particule est dirigée vers les lymphocytes T à modifier par l'anticorps de ciblage présent à sa surface ; elle fusionne avec ces cellules T et y introduit son chargement d'ARN messager qui va diriger la synthèse d'un CAR (*chimeric antigen receptor*) dirigé vers les cellules B à éliminer (extrait partiel et modifié de la [figure 1](#) de [6]).

En conclusion



- 1) Pertinence clinique?
 - Quantification
 - Populations immunitaires
- 2) Perspectives
 - TCE / CAR in vivo: suivi?
- 3) Stratégie de monitoring: guidelines UNITC