



UNIVERSITÉ DE LILLE

FACULTÉ DE MÉDECINE HENRI WAREMBOURG

Année : 2023

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN MÉDECINE

**Immunophénotypage lymphocytaire appliqué au domaine des CAR-T cells,
à propos d'une cohorte rétrospective monocentrique**

Présentée et soutenue publiquement le 9 octobre 2023 à 14 heures
au Pôle Recherche de la Faculté de Lille
par **Guillaume CHANTEAU**, nom d'usage **CHANTEAU-TIETZE**

JURY

Président :

Monsieur le Professeur Thierry FACON

Assesseurs :

Monsieur le Professeur Ibrahim YAKOUB-AGHA

Monsieur le Professeur Franck MORSCHHAUSER

Madame le Docteur Julie DEMARET

Directeur de thèse :

Monsieur le Docteur Paul CHAUVET

AVERTISSEMENT

La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ARN : Acide RiboNucléique
CAR : Chimeric Antigen Receptor
CCR7 : CC-chemokine receptor 7
CD : Cluster de différenciation
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CMF : Cytométrie en Flux
CMV : Cytomégalovirus
CPAg : Cellules présentatrices d'Antigènes
CRES : CAR-T cell Related Encephalopathy Syndrome
CRS : Cytokine Releasing Syndrome
CSH : Cellule souche Hématopoïétique
CTL : Lymphocyte T cytotoxiques
DAMPs : Danger Associated Molecular Patterns
DLBCL : Lymphomes B Diffus à Grandes Cellules
EFS : Établissement Français du Sang
FL: Lymphome Folliculaire
FSC : Forward Scatter
GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GVHD: Graft versus Host Disease
GVL: Graft versus Leukemia
HLA: Human Leucocyte Antigen
ICANS: Immune effector-Cell Associated Neurotoxicity Syndrome
ICOS : Inducible T-cell COStimulator
IHC : Immunohistochimie
IL : Interleukine
ITAM :Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
LAL : Leucémie Aigues Lymphoblastique
LB: Lymphocytes B pour Bone Marrow
LBCL: Large B-Cell Lymphoma
Lck : Lymphocyte-Specific protein tyrosine Kinase
LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique
LNH : Lymphome Non Hodgkinien
LNK : Lymphocytes Natural Killer
LT : Lymphocytes Thymiques
LTR : Long Terminal Repeat
MTI : Médicament de Thérapie Innovante
PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell
PCR : Polymerase Chain Reaction
PTPRC : Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type C
scFv : Single chain Variable fragment
SSC : Side Scatter
TCM : Lymphocyte T Central Mémoire
TCR : T Cell Receptor
TEM : Lymphocyte T effecteur mémoire
TTD : Lymphocyte T de différenciation terminale
TN : Lymphocyte T naïfs
TNF- α : Tumor Necrosis Factor Alpha
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

Table des matières

AVERTISSEMENT	
REMERCIEMENTS	
LISTE DES ABREVIATIONS	
RESUME	2
INTRODUCTION.....	
I. CAR-T CELLS.....	3
A) Généralités et mode d'action des CAR-T cells	3
B) Historique et indications.....	6
C) Production des CAR-T cells	8
D) Effets indésirables.....	14
II. L'IMMUNOPHENOTYPAGE LYMPHOCYTAIRE.....	20
A) Notions fondamentales	20
B) Immunophénotypage lymphocytaire	22
C) Immunophénotypage des CAR-T cells	22
D) Marqueurs des sous-populations lymphocytaires T	24
E) Immunophénotypage des sous-populations lymphocytaires T	26
F) Facteurs modifiant le phénotype des lymphocytes T	29
G) Propriétés des lymphocytes immatures	29
III. LYMPHOMES B DIFFUS A GRANDES CELLULES.....	32
A) Généralités et épidémiologie.....	32
B) Classification	32
C) Traitement	33
IV. RATIONNEL DE L'ETUDE	35
V. OBJECTIFS	35
ARTICLE.....	36
METHODES.....	41
RESULTATS.....	46
DISCUSSION	86
BIBLIOGRAPHIE	93

RESUMÉ

Contexte :

Les CAR-T cells ont révolutionné le pronostic de nombreux patients atteints d'hémopathies malignes en rechute ou réfractaires. Cependant, l'efficacité et la tolérance sont hétérogènes entre les patients. Ce traitement s'accompagne d'effets indésirables importants comme le Syndrome de Relargage de Cytokines (CRS) et la Neurotoxicité. Les CAR-T cells sont fabriqués à partir de lymphocytes T issus d'une leucaphérèse. Ces cellules peuvent être analysées par immunophénotypage lymphocytaire. L'objectif est d'évaluer l'intérêt de cet examen pour prédire la transduction, la réponse et la toxicité du traitement par CAR-T cells.

Méthode :

Nous avons suivi une cohorte rétrospective monocentrique de patients traités par CAR-T cells et ayant bénéficié d'un immunophénotypage lymphocytaire sur leucaphérèse et sur produit de CAR-T cells. Nous avons étudié les sous-populations de lymphocytes T et les avons classés en 4 sous-populations : naïfs (TN), central mémoire (TCM), effecteur mémoire (TEM) et de différenciation terminale (TTD) à l'aide de 4 marqueurs (CD4, CD8, CD45RA et CCR7). Les comparaisons ont été réalisées par tests bilatéraux et seuil significatif à 5%. La survie globale et la survie sans progression ont été estimées par méthode de Kaplan-Meier.

Résultats :

81 patients ayant reçu différents CAR-T cells ont été inclus avec un taux de transduction médian de 65,4%, qui n'est pas corrélé aux populations d'intérêts du produit de leucaphérèse. Dans un sous-groupe de 32 patients réinjectés par Axi-cel on retrouve une association entre une élévation des TN CD4 dans le produit de leucaphérèse et le risque de CRS de grade > 1 ($p=0,01$) et ces TN CD4 avec le taux de CAR-T à J7 ($p=0,007$). On retrouve une association entre le taux de CAR-T à J7 et le risque de CRS de grade > 1 ($p=0,006$). Les lymphocytes CCR7 CD8 du produit de leucaphérèse sont associés au risque d'anémie de Grade > 2 ($p=0,03$). Aucune population de la leucaphérèse n'est associée à la réponse aux CAR-T cells.

Conclusion :

L'immunophénotypage lymphocytaire du produit de leucaphérèse n'est pas prédictif d'une meilleure transduction ou efficacité après CAR-T cells. L'étude du produit de leucaphérèse pourrait permettre de prédire le risque de CRS de grade > 1 et d'anémie de grade > 2.

INTRODUCTION

I. CAR-T cells

A) Généralités et mode d'action des CAR-T cells

Les CAR-T cells font partie de la famille des Médicaments de Thérapie Innovante (MTI) et sont issus de la modification de lymphocytes T par ingénierie génétique pour exprimer un récepteur membranaire chimérique appelé CAR (Chimeric Antigen Receptor).(1) Le CAR est chimérique car composé d'un fragment Fab (Fragment antigen-binding) issu d'une immunoglobuline provenant d'un lymphocyte B (LB) et d'une portion intra-cellulaire issue d'un TCR (T-Cell Receptor) de lymphocyte T (LT).

La partie extra-cellulaire du CAR est formée par le fragment Fab modifié aussi appelé scFv (Single chain variable Fragment) dont le rôle est de reconnaître un antigène d'affinité. La partie intra-cellulaire du CAR comporte un domaine CD3 (Cluster de Différenciation) et un domaine de co-stimulation. Cette partie intra-cellulaire permet la transduction du signal et l'activation des CAR-T cells.

Les parties intra-cellulaires et extra-cellulaires sont reliées par un « spacer » produit à partir d'une molécule CD8 ou d'Immunoglobuline G1 (abrégé Ig G1) (Figure 1). (2)

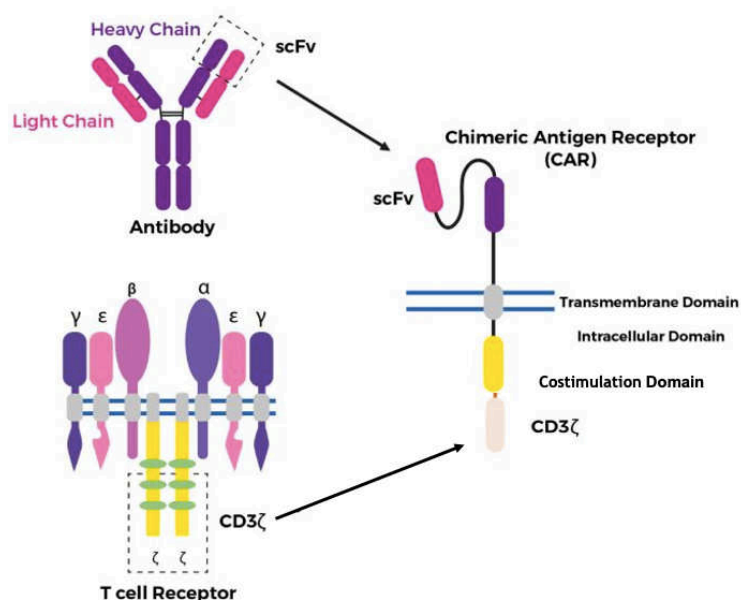


Figure 1 : Structure des CAR-T cells (3)

Une fois réinjectés, les CAR-T cells vont circuler dans le sang et migrer vers les différents tissus et notamment vers les zones tumorales.

Le fragment scFv du CAR va reconnaître sa cible antigénique, par exemple le CD19 (glycoprotéine de surface exprimée par la majorité des lymphocytes B). (4)

Les lymphocytes T et CAR-T cells nécessitent plusieurs signaux d'activation :

- le signal 1, correspondant à la reconnaissance de l'antigène d'affinité par le TCR du lymphocyte T ou par le fragment scFv du CAR. Pour les lymphocytes T, l'antigène est présenté par une molécule du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) aussi appelé Human Leukocyte Antigen (HLA) de classe I pour les LT 8 cytotoxiques et CMH de classe II pour les LT 4 auxiliaires. Pour les CAR-T cells, le fragment scFv ne nécessite pas de présentation via une molécule du CMH (mode d'échappement tumoral par diminution d'expression de molécule du CMH des Cellules Présentatrices d'Antigènes (abrégié CPAg). (5,6) La reconnaissance de l'antigène entraîne l'activation du CD3 et la phosphorylation des domaines ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) initiant une cascade de signalisation intra-cellulaire. (7)

- le signal 2 ou costimulation est réalisé par liaison entre une molécule CD80 ou CD86 portée par la cellule présentatrice d'antigène et une molécule type CD28 ou 4-1BB (synonyme CD137) ou ICOS (Inducible T-cell COStimulator) portée par le LT. Le CAR-T cell possède un domaine de costimulation intégré dans le CAR, permettant une activation de la costimulation simultanée au signal 1. Le signal 2 permet la translocation nucléaire de facteurs de transcriptions comme le NfκB (Nuclear factor kappa Beta), favorisant ainsi la synthèse d'Interleukine (IL)-2, et l'augmentation de l'expression membranaire du récepteur à l'IL-2, le CD25. L'IL-2 permet d'améliorer l'expansion des LT tout en leur évitant l'anergie et l'apoptose (Figure 2).

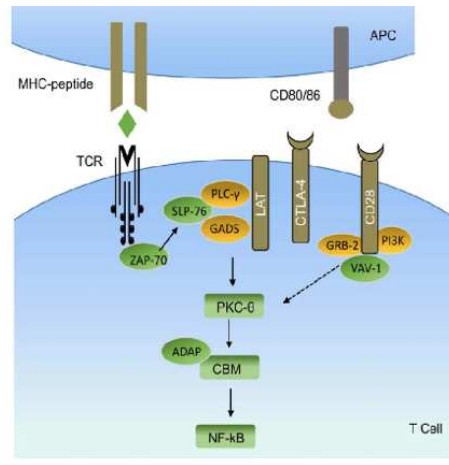


Figure 2 : Voie d'activation NfκB dans le Lymphocyte T selon Thaker et al. (8)

Il existe un troisième signal qui est médié par les concentrations en cytokines, permettant de moduler la prolifération lymphocytaire T et polariser la réponse du LT ou du CAR-T cell vers une réponse adaptée (Figure 3). (9,10)

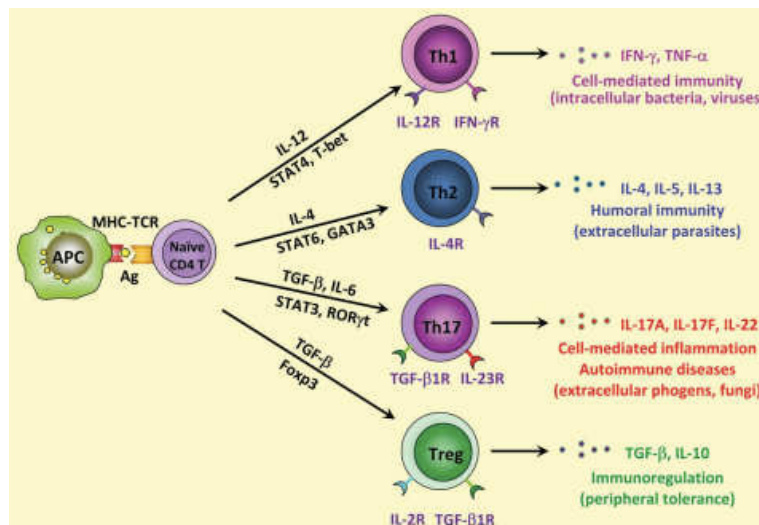


Figure 3 : Polarisation de la réponse immunitaire T selon Leung et al.(10)

La polarisation des CAR-T cells est particulière avec proportion importante de CAR-T cells Th1 (toxicité de courte durée) (11), plus faible quantité de Th2 et très faible quantité de CAR-T cells polarisés Th17 (12). Les CAR-T cells prolifèrent et s'expandent du fait de ce mode d'activation spécifique. Les CAR-T cells CD8 exerceront une action cytolytique directe via libération de molécules de Perforine et Granzyme B. Les CAR-T cells CD4 sont dits auxiliaires et modulent l'environnement cytokinique (production d'IL-2, d'Interféron-Gamma et d'IL-12) permettant une potentialisation de la réponse immunitaire vers la destruction des cellules tumorales. (15,16) (Figure 4).

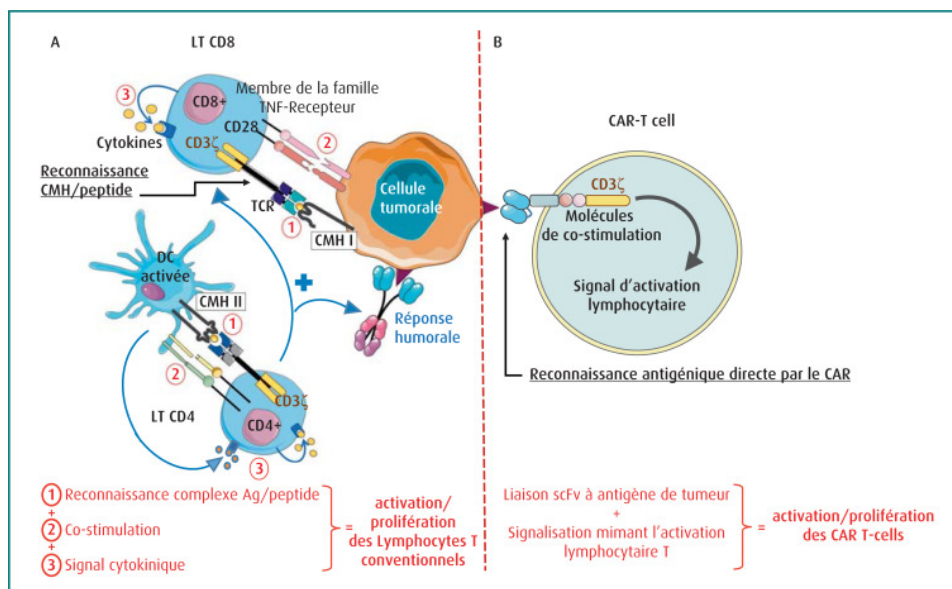


Figure 4 : Mécanisme d'activation d'un Lymphocyte T (A) et d'un CAR-T cell (B) selon Rubio et al.(13)

La persistance dans le temps des CAR-T cells dépend du type de domaine de co-stimulation utilisé par les CAR-T cells. La persistance est plus longue pour les CAR-T cells possédant un domaine de co-stimulation de type 4-1BB en comparaison aux CAR-T cells possédant un domaine de co-stimulation CD28. Cette différence est liée au fait que le domaine de co-stimulation 4-1BB augmente la sensibilité des CAR-T cells à l'action du NfκB, leur conférant une résistance accrue à l'apoptose.(14)

B) Historique et indications

Les premiers essais de fabrication de CAR-T cells ont débuté à partir de 1989 sous l'essor d'ESHAR, GROSS et WAKS au WEIZMANN Institute of Science à REHOVOT en Israël. (17) Ces CAR-T cells de 1^{ère} première génération sont générés à partir d'un scFv issu du fragment Fab, associé au domaine CD3zeta issu d'un TCR, sans domaine de co-stimulation associé. Cette première génération de CAR-T cells est caractérisée par une faible production d'Interleukine-2 (IL-2) responsable d'une survie réduite avec faible expansion et manque d'efficacité in vivo. (18) (2) Plus récemment, de nouvelles générations de CAR-T cells ont vu le jour (Figure 5).

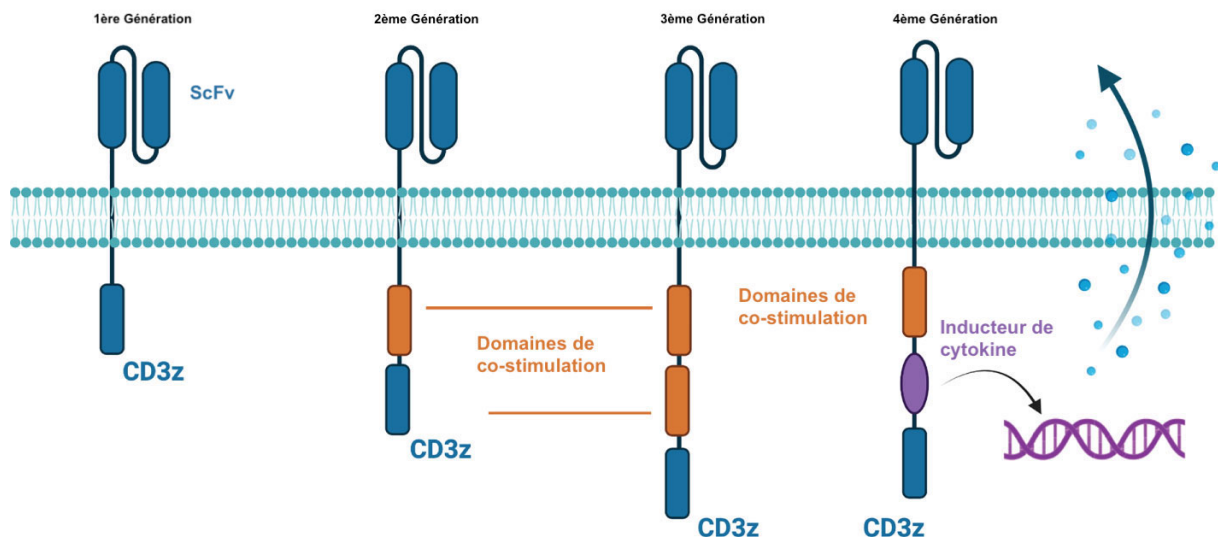


Figure 5 : Différentes générations de CAR-T cells selon Tomasik et al. (19)

La 2^{ème} génération de CAR-T cells se base sur le modèle de la première génération avec l'ajout d'un **domaine de costimulation intracellulaire** de type CD28 ou de type 4-1BB permettant une meilleure activation du CAR-T cells, améliorant sa fonction, sa prolifération et sa survie. (20) Les premières réponses in vivo aux CAR-T cells ont été obtenues chez des patients atteints de Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) et de LAL B (21,22). Par la suite, plusieurs essais cliniques ont mené à l'autorisation de mise sur le marché aux Etats-Unis puis en Europe des différents CAR-T cells de 2^{ème} génération, actuellement utilisés en pratique courante :

- Axicabtagene ciloleucel ou Axi-cel, nom commercial YESCARTA, ciblant le CD19 et possédant un domaine de co-stimulation CD28, il est indiqué dans la prise en charge des lymphomes B diffus à grandes cellules en 3^{ème} ligne suite à l'essai ZUMA-1(23) ; en 2^{ème} ligne chez les patients réfractaires primaires ou en rechute précoce (< 12 mois) suite à l'essai ZUMA-7(24); en 4^{ème} ligne de traitement chez les patients atteints de lymphome folliculaire et de la zone marginale en rechute ou réfractaires après au moins trois lignes de traitements systémiques suite à l'essai ZUMA-5(25).

- Tisagenlecleucel ou Tisa-cel, nom commercial KYMRIA, ciblant le CD19, et possédant un domaine de co-stimulation 4-1BB, il est indiqué dans la prise en charge des lymphomes B diffus à grandes cellules en 3^{ème} ligne suite à l'essai JULIET(26) ; dans le cadre des lymphomes folliculaires réfractaires en 3^{ème} ligne de traitement suite à l'essai ELARA(27) ; dans le cadre des

leucémies aiguës lymphoblastiques B réfractaires ou en rechute après greffe ou après 2^{ème} ligne de traitement chez l'enfant et jeunes adultes jusqu'à 25 ans suite à l'essai ELIANA (28).

- Brexucabtagene autoleucel ou Brexu-cel, nom commercial TECARTUS, ciblant le CD19 et possédant un domaine de co-stimulation CD28, il est indiqué dans le cadre de la prise en charge des lymphomes du Manteau après 2 lignes de traitement dont un inhibiteur de BTK, à la suite de l'essai ZUMA-2 (29) ; dans le cadre des leucémies aiguës lymphoblastiques B Phi ou non Phi si échec ou inégibilité à l'INOTUZUMAB et au BLINATUMOMAB en 2^{ème} ligne chez les patients de plus de 26 ans à la suite de l'essai ZUMA-3.(30)

- Lisocabtagene maraleucel ou Liso-cel, nom commercial BREYANZI, ciblant le CD19 et possédant un domaine de co-stimulation 4-1BB, il est indiqué dans le cadre de la prise en charge d'un DLBCL/PBMCL/Folliculaire Grade 3B en 3^{ème} ligne et 2^{ème} ligne chez les patients réfractaires primaires ou en rechutes précoces (< 12 mois) suites aux essais TRANSCEND et TRANSFORM (31,32).

- Idecbtagene vicleucel ou Ide-cel, nom commercial ABECMA, ciblant BCMA et possédant un domaine de co-stimulation 4-1BB, il est indiqué dans le cadre de la prise en charge des myélomes en rechute ou réfractaires après 3 lignes de traitements antérieurs dont un immunomodulateur (IMiD), un inhibiteur du protéasome et un anticorps anti-CD38, à la suite des essais KarMMa. (33,34)

- Cilcabtagene autoleucel ou Cilta-cel, nom commercial CARVYTKI ciblant BCMA et possédant un domaine de co-stimulation 4-1BB, il est indiqué dans le cadre de la prise en charge de myélomes en rechutes ou réfractaires après 3 lignes de traitements antérieurs dont un IMiD, un inhibiteur du protéasome et un anticorps anti-CD38, à la suite à l'essai CARTITUDE-1.(35)

C) *Production des CAR-T cells*

a) Circuit global

Les CAR-T cells sont issus d'un prélèvement d'aphérèse cellulaire (leucaphérèse) réalisé au centre d'aphérèse puis acheminé au secteur de thérapie cellulaire de l'Établissement Français du sang (EFS).

Les poches de leucaphérèse sont ensuite congelées puis acheminées au laboratoire pharmaceutique pour production de CAR-T cells.

À l'issue des différentes étapes de production, plusieurs contrôles qualité sont effectués puis les CAR-T cells sont congelés (cryopréservation à -80°C) avant d'être envoyés à la pharmacie hospitalière. Le patient est convoqué en hospitalisation pour chimiothérapie de lymphodépletion avant réinjection des CAR-T cells et surveillance hospitalière (Figure 6). (36)

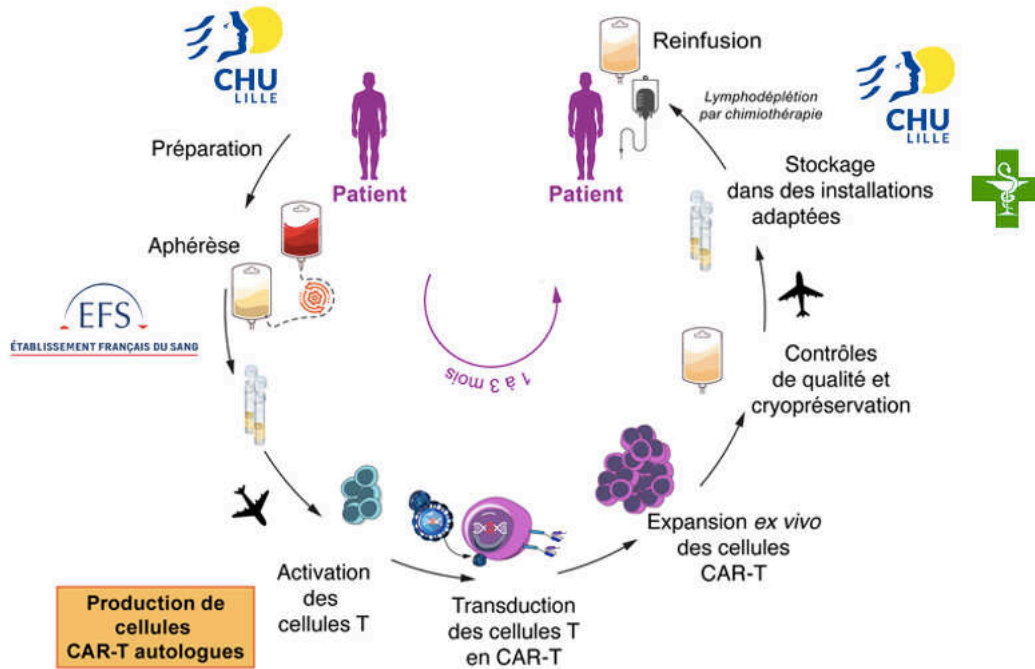


Figure 6 : Circuit des CAR-T cells au CHU de Lille adapté(37)

b) Leucaphérèse

La leucaphérèse consiste à recueillir les cellules mononucléées périphériques du patient (PBMC). Il s'agit d'un recueil de cellules autologues, les cellules seront donc réinjectées au patient qui a été prélevé initialement. Les patients devant bénéficier de CAR-T cells dans le cadre de la prise en charge d'hémopathies malignes nécessitent parfois un traitement pour contrôler la maladie en attendant la réinjection de CAR-T cells.

Ces traitements d'attente associent le plus souvent des immunothérapies ou des chimiothérapies qui peuvent être toxiques pour les Lymphocytes. Afin d'obtenir un produit d'aphérèse de bonne qualité et pour ne pas endommager les lymphocytes T du patient, ces traitements doivent être suspendus avant leucaphérèse (Figure 7).

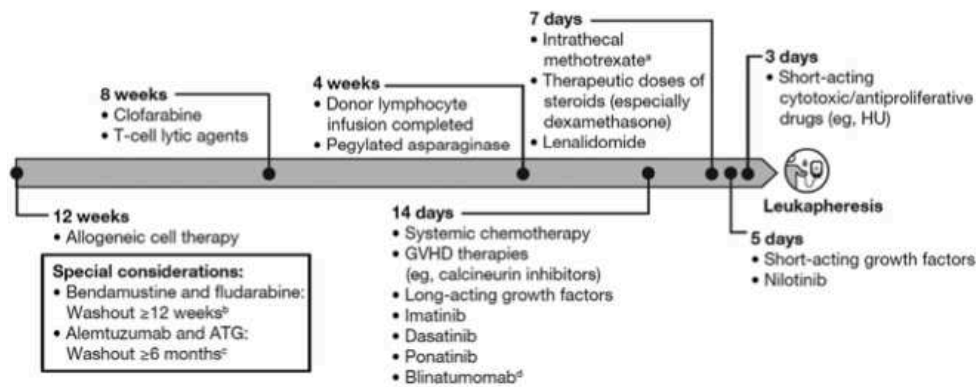


Figure 7 : Délais d'arrêt des traitements avant leucaphérèse selon Qayed et al.(38)

D'autres conditions sont nécessaires pour réaliser une leucaphérèse dans de bonnes conditions :

- Deux voies d'abord veineuses sont nécessaires avec une voie pour prélever les cellules mononuclées du patient et l'autre voie pour réinjecter les érythrocytes et plaquettes. Le capital veineux périphérique de ces patients est souvent altéré du fait de l'exposition à des chimiothérapies veino-toxiques (39), raison pour laquelle une voie veineuse centrale double lumière de gros calibre (< 14 Gauge) est souvent nécessaire. (40)
- Un taux minimal de lymphocytes > 0,2 G/L ou > 0,5 G/L (pas de seuil consensuel) suivant les types de CAR-T cells. (41–43).
- Une hémoglobine > 8 g/dL ou un hémocrite > 26%, un taux de polynucléaires neutrophiles > 1 G/L et un taux de plaquettes > 30 G/L (ces objectifs peuvent varier suivant le type de leucaphérèse et le type de CAR-T cell envisagé). (44)

Il conviendra également de monitorer la calcémie, la magnésémie et d'évaluer la fonction rénale du fait de l'utilisation d'anticoagulants dans le circuit d'aphérèse (Acide Citrate Dextrose A ou Héparine). Il est parfois nécessaire chez les patients de faible poids, en pédiatrie ou chez les sujets âgés de réaliser la leucaphérèse sur plusieurs journées. (38,44)

Les principaux facteurs connus pour diminuer l'efficacité de la leucaphérèse sont :

- un âge avancé lors de la leucaphérèse,
- un taux de plaquettes élevé,
- un diagnostic de Leucémie Aiguë Lymphoblastique avec blastose circulante. (45)

Au CHU de Lille, la leucaphérèse est réalisée au Centre de prélèvement des aphérèses cellulaires. Le patient est branché en circuit sur un automate de type Spectra Optia® qui prélève et trie les cellules. Les cellules prélevées lors de la leucaphérèse sont les cellules mononucléées du sang composées des lymphocytes et des monocytes du patient.

Certains centres réalisent une déplétion monocyttaire qui permettrait de diminuer l'activation lymphocytaire précoce durant la fabrication des CAR-T cells, ce qui permet de les maintenir à l'état de lymphocyte naïf. Cette déplétion monocyttaire permettrait in fine d'augmenter le taux d'expression de CAR-T cells. (46–49)

Une fois la leucaphérèse terminée, le produit de leucaphérèse est adressé au Service de Thérapie cellulaire de l'Établissement Français du Sang (EFS) puis transféré au laboratoire pour production des CAR-T cells. Le produit de leucaphérèse peut être analysé afin de pouvoir évaluer le nombre de cellules nucléées totales viables ainsi que le nombre de Lymphocytes T (CD3) viables. Un immunophénotypage lymphocytaire peut être réalisé pour déterminer les différentes sous populations du produit de leucaphérèse(Figure 8). Les cellules de la poche de leucaphérèse sont séparées par taille et granularité puis analysées suivant différents marqueurs antigéniques de surface (cf. II. L'immunophénotypage lymphocytaire, Figure 20)

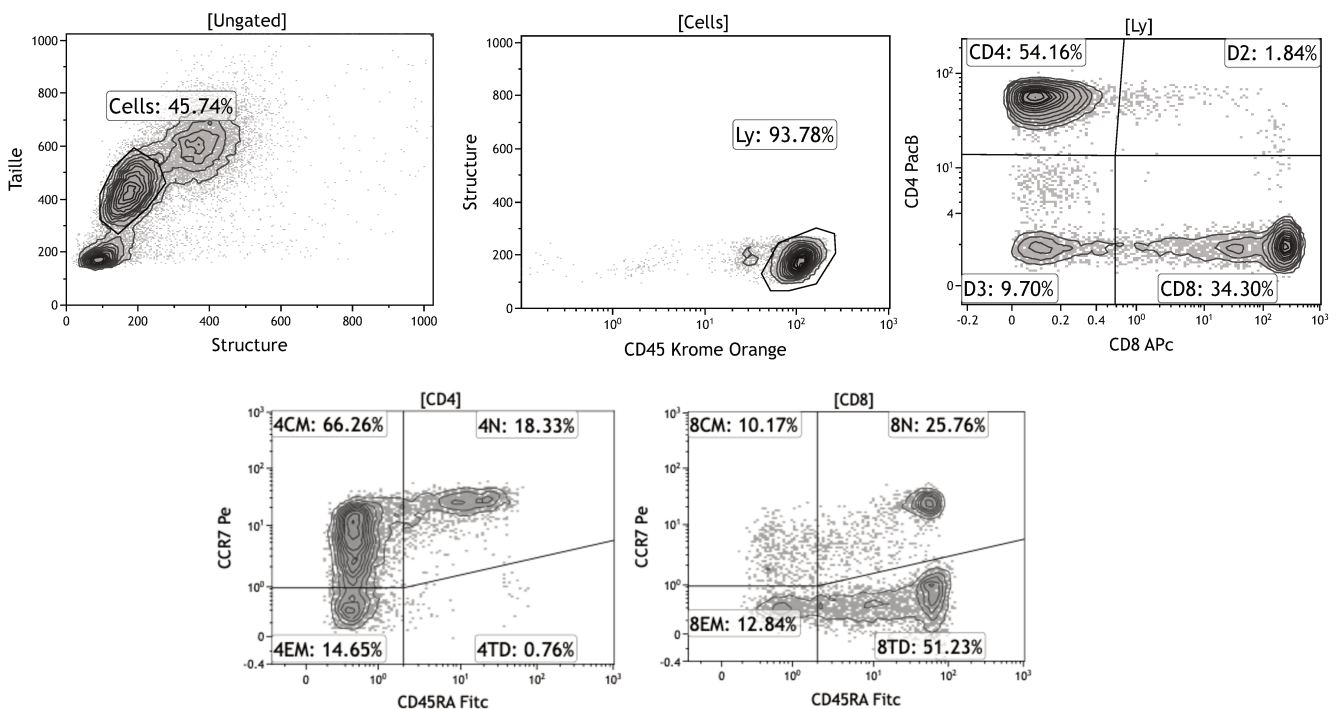


Figure 8 : Exemple d'immunophénotypage lymphocytaire sur produit de leucaphérèse au CHR de Lille

c) Sélection et isolement des lymphocytes T

À partir du produit de leucaphérèse, les lymphocytes T sont sélectionnés puis stimulés par différentes méthodes :

- exposition à des Cellules Présentatrices d'Antigènes,
- billes magnétiques couplées à des anticorps anti CD3/anti CD-28 type Dynabeads™, TransAct™ beads ou ExpAct™ Treg beads ou par solutés réactifs type Expamer™,
- exposition à des facteurs de croissance lymphocytaire comme l'IL-2, IL-7 ou l'IL-15 (50) afin d'être activés, entraînant une modification du phénotype lymphocytaire. (51)

d) Transfection du transgène CAR

Pour les CAR-T cells de deuxième génération, la transfection permettant aux LT d'exprimer le CAR est réalisée au moyen de vecteurs viraux, on parle alors de transduction. Les deux familles de rétrovirus utilisées, gamma-rétrovirus (Axi-cel) et lentivirus (Tisa-cel, Liso-Cel), possèdent un génome à ARN (Acide Ribonucléique). Leur génome est modifié avec intégration du transgène du CAR. Les rétrovirus sont mis en culture avec les LT ce qui permet la pénétration intra-lymphocytaire des rétrovirus transgéniques sans engendrer de réponse immunitaire. Contrairement aux lentivirus, la transduction par gamma-rétrovirus s'effectue sur lymphocyte en division cellulaire et nécessite donc une étape d'activation lymphocytaire. (13)

L'ARN viral contenant le transgène du CAR est alors converti en ADN par une transcriptase inverse puis intégré au génome du LT, on utilise le terme de vecteur viral intégratif. (52) Il pourra ensuite être transcrit puis traduit par le LT pour exprimer le CAR à sa surface. (53)

e) Expansion in vitro du produit de CAR-T, contrôles Qualité

Une fois transfectés, les CAR-T cells subissent une étape d'expansion in vitro afin d'obtenir une importante quantité de CAR-T cells, nécessaire pour une bonne efficacité après réinjection. Différentes méthodes d'expansion sont utilisées :

- des bioréacteurs maintenus à température constante permettant des échanges gazeux entre les différents milieux (par exemple le système CliniMACS Prodigy™, permet d'automatiser

l'ensemble de la chaîne de production),

- une stimulation à l'IL-2 et IL-21 en présence de CPAg irradiées et modifiées pour ne pas exprimer de molécules HLA (mais uniquement des molécules de costimulation) permettant l'expansion des CAR-T cells tout en orientant la différenciation des CAR-T cells vers un phénotype de cellules mémoires. (54) La fabrication des CAR-T cells est un procédé complexe nécessitant l'implication de pharmaciens, biologistes, techniciens et d'ingénieurs. L'ensemble du processus dure entre 8 et 12 jours (hors délais d'acheminement aux laboratoires). Tout au long de la fabrication, il est nécessaire de réaliser des contrôles afin d'obtenir un médicament de bonne qualité et sans danger pour le patient (Figure 9).

Parameter	Method	Acceptance criteria
Appearance	Visual inspection	Cloudy liquid solution
CAR+ cells (%) ^a	Flow cytometry	>20%
CD3+ cells (%)	Flow cytometry	>70%
Cell viability (%)	Neubauer cell counting with trypan blue exclusion ^b	>70%
Sterility	Microbial growth E. Ph. 2.6.1	Sterile from bacteria/fungi
Mycoplasma	PCR ^c	Absent
Endotoxin	Chromogenic assay	<0.5 EU/mL
<i>Optional/R&D</i>		
CAR/CD45RA/CCR7 For detection of TE/ TEM/TEMRA/TCM/TN subpopulations	Flow cytometry	A high proportion of immature T cells is desirable for a long-lasting CAR-T cell effect in the patient
Cytotoxic potency	Cr-51 release assays in tumour CAR-T cell co-culture, assessed by flow cytometry	>40% killing at an effector/target ratio of 10:1 (or higher ratio) in a 4-h assay
Adventitious viruses	PCR	Absent
Number of transgene copies/cell	Real-time PCR (Kunz et al. 2019; Schubert et al. 2020)	<10 (range <7–15!) copies/cell ^d

^aAutomated cell counters, such as Luna™, are highly recommended

^bHighly specific detection reagents (e.g., the Miltenyi Detection Reagent™) are strongly advised to distinguish CAR-T cells from the negative fraction

^cEuropean standards stipulate PCR methodology, in contrast to US regulations, which require serology

^dDiffers between countries and products

Figure 9 : Critères Qualité rapportés par Delgado et al. (55)

f) Lymphodéplétion et réinjection

La lymphodéplétion est une chimiothérapie de conditionnement précédant la réinjection des CAR-T cells. Elle a lieu une semaine avant la réinjection et est suivie d'une période de repos de 2 jours pour éviter la destruction des CAR-T cells réinjectés. La lymphodéplétion permet d'améliorer l'efficacité des traitements basés sur le transfert d'immunothérapies adaptatives comme les CAR-T cells. (56–58) Elle permet de diminuer le taux de lymphocytes (T, B, NK)

résiduels du patient et d'optimiser le milieu cytokinique. Elle a également un rôle d'immunomodulation tumorale avec éradication des cellules myéloïdes suppressives et des LT régulateurs qui inhiberaient l'action des CAR-T cells. (59) La lymphodéplétion permet d'amplifier l'expansion des CAR-T cells, d'accroître leur persistance in vivo ce qui augmente le taux de réponse et la durée de réponse aux CAR-T cells. (60)

En parallèle, la lymphodéplétion entraîne des cytopénies pendant 10-14 jours associées à une immunosuppression cellulaire T responsable d'une augmentation du risque infectieux. Les traitements les plus fréquemment utilisés pour la lymphodéplétion sont :

- la FLUDARABINE à une dose de 25 à 30mg/m² pendant 3 jours suivi de 2 jours de pause avant réinjection. Ses principaux effets indésirables sont les cytopénies, l'hyperthermie, les neuropathies périphériques et atteintes neurologiques centrales. En cas de contre-indication à la FLUDARABINE (insuffisance rénale sévère), celle-ci peut être remplacée par de la BENDAMUSTINE.

- le CYCLOPHOSPHAMIDE à une dose allant de 300 à 500mg/m² pendant 3 jours suivi de 2 jours de pause avant réinjection. Ses principaux effets indésirables sont les cytopénies, la cystite hémorragique et les péricardites. Ces deux molécules augmentent également le risque de cancers secondaires. Une dose plus importante de CYCLOPHOSPHAMIDE serait associée à un profil de cytokines favorable au développement des CAR-T cells. (61,62)

Les patients sont réinjectés des CAR-T cells au J0 puis sont surveillés en secteur d'hospitalisation pour une durée moyenne de 14 jours afin de prendre en charge d'éventuels effets indésirables.

D) Effets indésirables

Les principaux effets indésirables des CAR-T cells sont le syndrome de relargage de cytokines (CRS) et les neurotoxicités liées aux CAR-T cells (multiples synonymes ICANS pour Immune Effector Cell Associated Neurotoxicity Syndrome, CRES pour Cell-Related Encephalopathy Syndrome, NT pour Neurotoxicité). On retrouve également d'autres effets indésirables fréquents comme les cytopénies et l'hypogammaglobulinémie secondaire lors d'injections de CAR-T cells anti-CD19. (63–65)

a) Syndrome de Relargage de Cytokines

Le Syndrome de Relargage de Cytokines (abrégé CRS en anglais pour Cytokine Releasing Syndrome) est caractérisé par une fièvre associée à divers symptômes (notamment frissons, tachycardie voire hypotension artérielle) qui débute dans les jours ou heures suivant la réinjection de CAR-T cells (66). Le CRS doit être gradé afin d'en estimer la gravité et d'adapter la prise en charge. La classification de Lee est la classification retenue pour adapter la prise en charge du CRS, (67,68) basée le plus souvent sur l'utilisation de DEXAMETHASONE et de TOCILIZUMAB, un anticorps monoclonal se fixant au récepteur de l'IL-6. (21,67) Il n'existe pas de marqueur spécifique de CRS permettant de faire la distinction avec une infection. (69) Ainsi, devant toute fièvre chez un patient réinjecté par CAR-T cells, il est nécessaire d'éliminer une infection (réaliser des prélèvements infectieux (hémocultures, ECBU, PCR virales...) et de ne pas hésiter à débiter une antibiothérapie en cas de neutropénie fébrile (Figure 10).

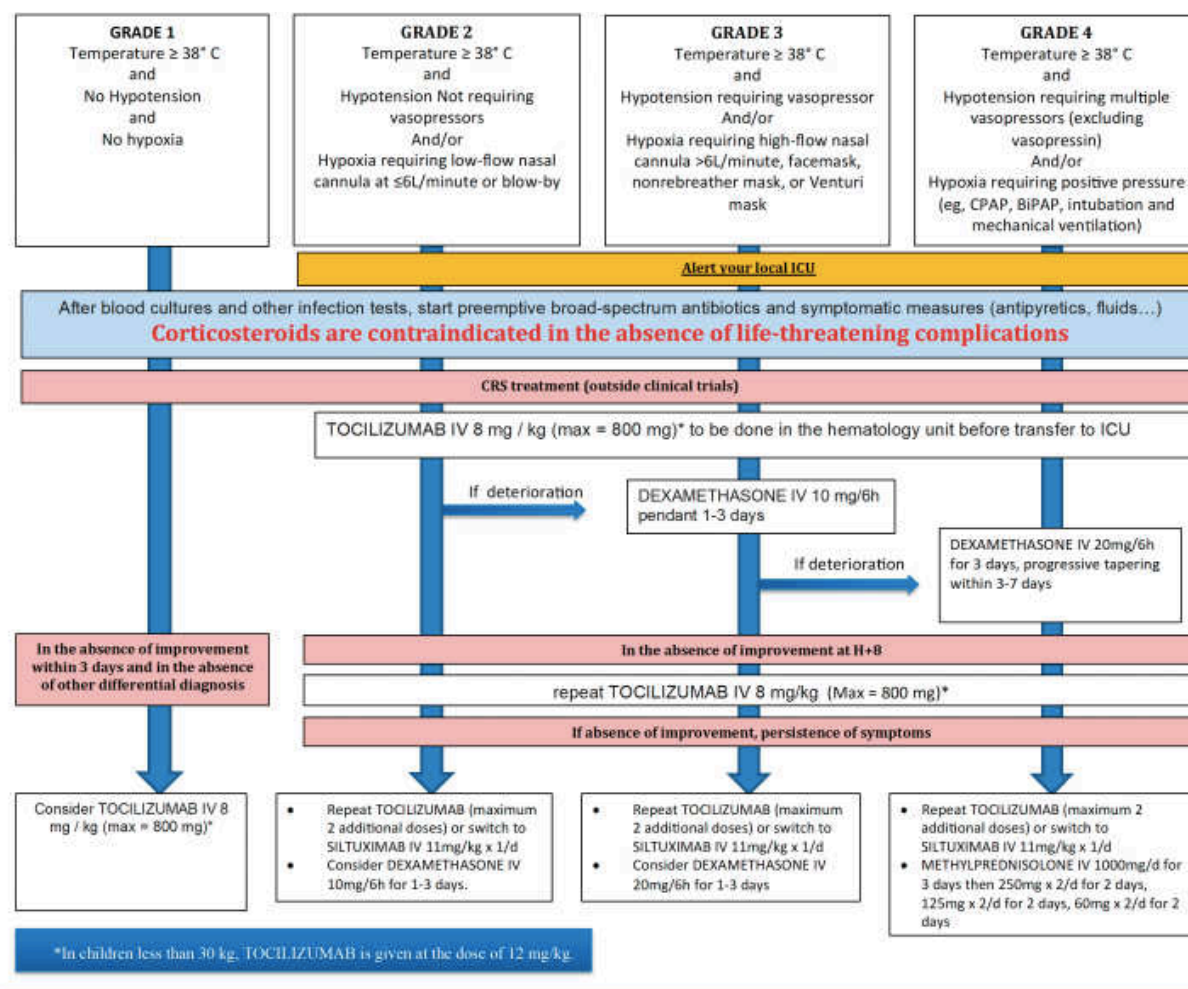


Figure 10 : Algorithme de prise en charge du CRS (44)

La physiopathologie du CRS est complexe et non complètement élucidée à l'heure actuelle.

L'activation des CAR-T cells va entraîner la synthèse :

- De cytokines pro-inflammatoires, notamment l'Interféron Gamma (IFN- γ) et le Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α),
- De molécules pyroptotiques comme la Perforine et le Granzyme B.

La Perforine vient former des pores dans la cellule tumorale permettant l'entrée du Granzyme B dans la cellule. Le Granzyme B active la cascade des Caspases permettant la formation de l'Apoptosome qui entraîne alors l'apoptose des cellules tumorales. La destruction des cellules tumorales est responsable de la libération de DAMPS (Danger Associated Molecular Patterns) qui activent par la suite les macrophages et les cellules dendritiques qui vont alors sécréter de l'IL-1-Beta et de l'IL-6. (68,69)

En parallèle, la sécrétion d'IFN- γ et de TNF- α va stimuler les cellules immunitaires innées, favorisant la présentation antigénique des débris cellulaires et l'activation des macrophages. Lors du CRS, les monocytes et les macrophages sont la principale source d'IL-6 et d'IL-1 Beta, qui, produites en grandes quantités, entraînent un orage cytokinique (Figure 11). (70,71)

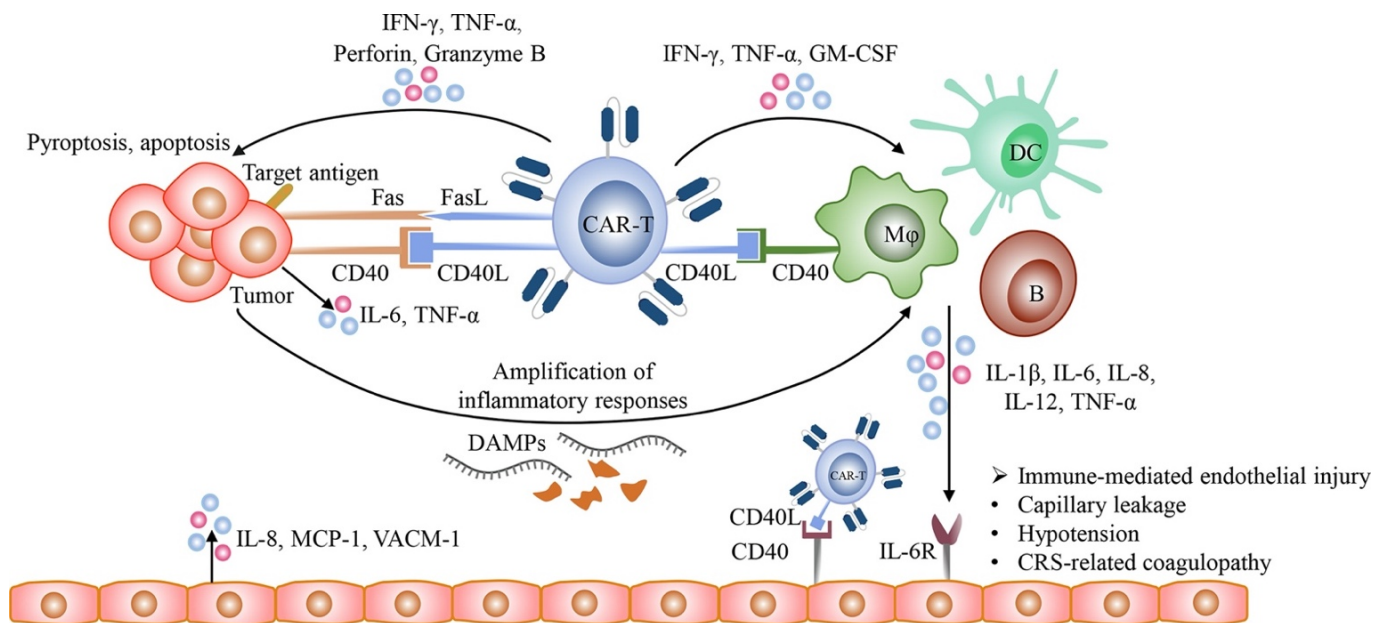


Figure 11 : Physiopathologie du CRS selon Zhang et al. (70)

Les principaux facteurs de risque de CRS sévères sont :

- Une hémopathie agressive type LAL,
- Une hémopathie non contrôlée avec critère de forte masse tumorale (69),
- Une Lymphodéplétion comprenant de la FLUDARABINE,
- Un pic de CAR-T cells plus élevé (72–74),
- Une quantité de CAR-T cells administrée plus importante. (69)

b) Neurotoxicité liée aux CAR-T cells

Le diagnostic de Neurotoxicité liée aux CAR-T cells est évoqué devant tout signe neurologique apparaissant au cours du mois suivant l'injection de CAR-T cells. Les signes cliniques sont extrêmement polymorphes allant de la somnolence au coma, des céphalées simples aux œdèmes cérébraux, des signes neurologiques focaux aux convulsions. Ils sont dépistés par une évaluation clinique réalisée au minimum deux fois par jour et mesure du score « Immune Effector Cell Encephalopathy » (abrégé ICE). (67,75) La NT intervient dans les jours qui suivent la réinjection des CAR-T cells et fait souvent suite à un CRS de haut grade, son incidence décroît pour devenir quasi nulle après J28.

La NT est le plus souvent réversible et n'engendre pas de séquelle neurologique à long terme. (76) La physiopathologie du NT est complexe et plusieurs mécanismes sont discutés. (77)

L'activation des CAR-T cells endommagerait l'endothélium par l'intermédiaire du système immunitaire et via la sécrétion d'IL-1 et d'IL-6. Les CAR-T cells anti-CD19 auraient également une action directe sur les péricytes, qui sont des cellules entourant les cellules endothéliales et formant la barrière hémato-encéphalique. Leur rôle est de moduler le calibre et la perméabilité vasculaire. (71) Du fait de l'altération de la barrière hémato-encéphalique, des cytokines pro-inflammatoires systémiques puis des éléments cellulaires du système immunitaire vont pénétrer dans le Système Nerveux Central entraînant des lésions au niveau des astrocytes et une activation des cellules microgliales. L'ensemble de ces réactions dérégulerait le fonctionnement des neurones et des cellules gliales entraînant une altération de la diffusion des neurotransmetteurs. On retrouve parfois de multiples microhémorragies cérébrales liées à des

phénomènes de microangiopathie thrombotique. (77) Ainsi, la NT serait majoritairement liée à l'action des cytokines sans action directe des CAR-T cells à l'intérieur du Système Nerveux Central (Figure 12). (78)

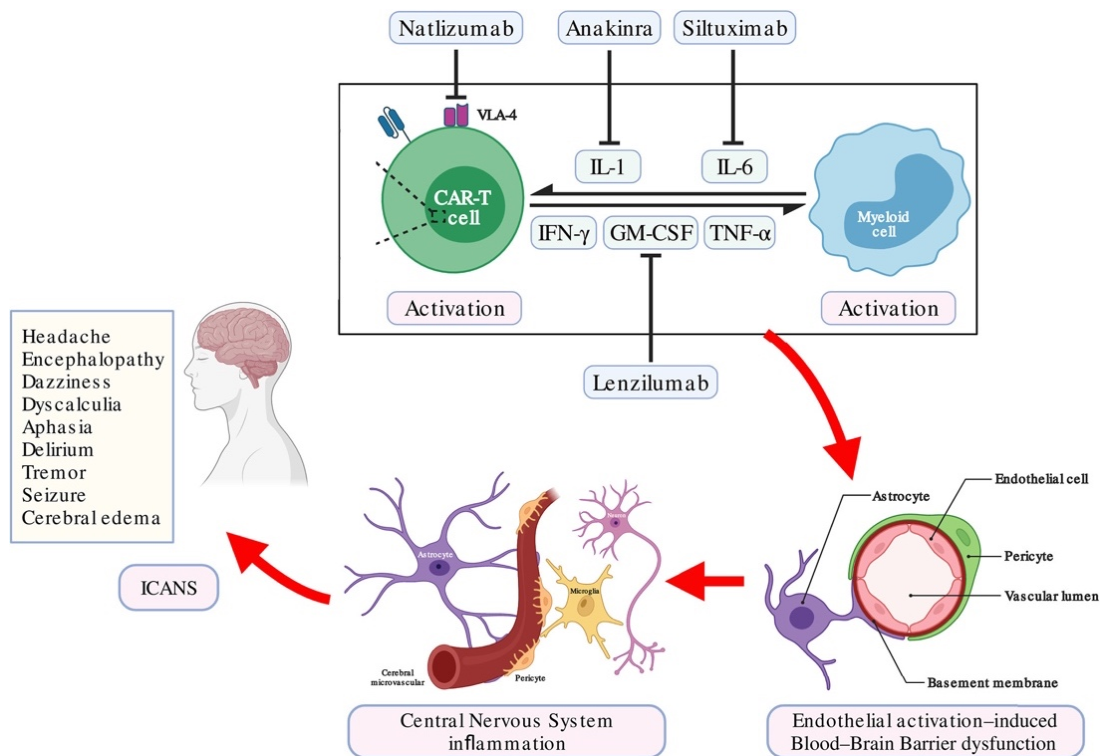


Figure 12 : Mécanisme de la Neurotoxicité selon Gu et al.(77)

Les principaux facteurs de risque de NT de grade élevé sont :

- CRS de haut grade,
- Pic de CAR-T cell élevé,
- Critère de forte masse tumorale (72,74,79,80),
- Terrain neurologique sous-jacent (80,81), mais les données sur un envahissement par une hémopathie/cancer sont contradictoires (69,82),
- Dose de CAR-T cells administrée plus importante (83)
- Les CAR-T de 2^{ème} génération avec domaine de costimulation CD28 seraient plus à risque NT avec des NT plus sévères en comparaison aux CAR-T cells possédant un domaine de costimulation 4-1BB. (84,85) Il est nécessaire de grader la NT et d'éliminer les diagnostics différentiels via différents examens (électroencéphalogramme, IRM cérébrale et éventuellement ponction lombaire). La prise en charge repose principalement sur l'utilisation de DEXAMETHASONE ou d'autres thérapeutiques comme de l'ANAKINRA, un inhibiteur du

récepteur à l'IL-1 lors de situations réfractaire à la corticothérapie. La prise en charge de la NT diffère également en cas de CRS concomitant (Figure 13).

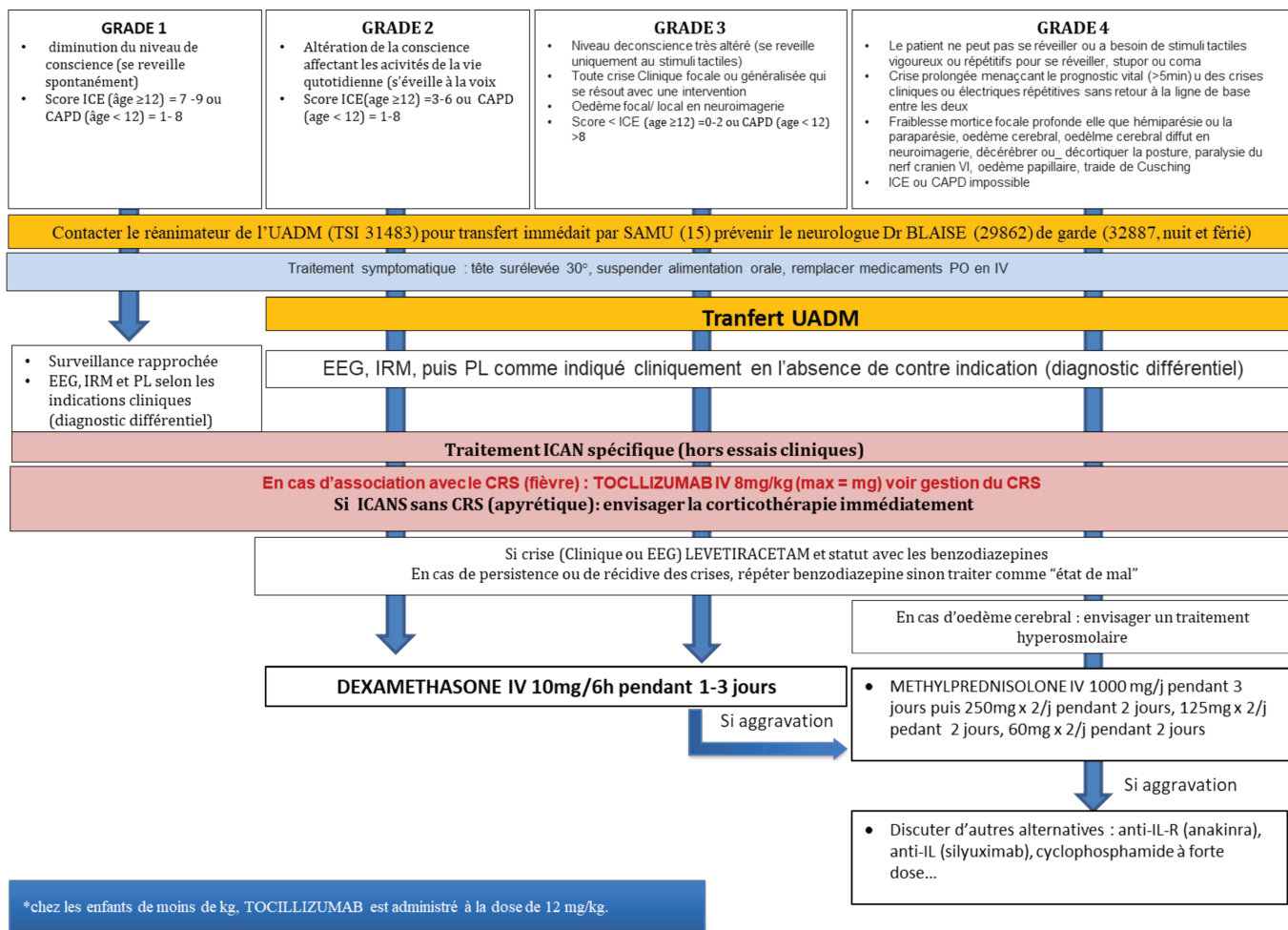


Figure 13 : Algorithme de prise en charge d'une Neurotoxicité liée aux CAR-T cells (83)

c) Autres complications

D'autres complications comme les cytopénies, l'hypogammaglobulinémie et les infections sont fréquentes après réinjection de CAR-T cells et nécessitent une prise en charge adaptée. (63–65,86)

Les CAR-T cells sont donc de véritables médicaments vivants nécessitant de multiples étapes pour leur production entraînant d'importantes modifications de fonctions.

L'immunophénotypage lymphocytaire permet d'étudier les différentes populations lymphocytaires T et les CAR-T cells.

II. L'immunophénotypage lymphocytaire

A) *Notions fondamentales*

La cytométrie en flux est une technique utilisée en biologie qui permet de caractériser et quantifier des cellules en suspension dans un liquide.

Les cellules passent dans une gaine fluidique et sont soumises une à une aux rayonnements de lasers possédant différentes longueurs d'onde (par exemple violet à 405nm, rouge 633nm, bleu 488nm). L'étude de la diffraction du laser dans l'axe de la cellule permet d'obtenir des informations sur sa taille et représente le Forward Scatter (FSC). L'étude de la réfraction du laser de manière perpendiculaire permet de connaître la structure interne de la cellule, qu'on appelle le Side Scatter (SSC). L'échantillon peut être incubé avec des anticorps couplés à des fluorochromes qui vont émettre une fluorescence de longueur d'onde spécifique sous l'action du rayonnement laser permettant de cibler des antigènes spécifiques et de reconnaître les différentes lignées cellulaires. Cette technique est appelée immunophénotypage et les principales cibles antigéniques utilisées sont présentées dans le Tableau 1. (87–89)

Cellules	Marqueurs antigéniques
Lymphocytes T	CD45, CD3, CD7, CD4, CD8...
Lymphocytes B	CD45, CD19, CD20...
Lymphocytes NK	CD45, CD16, CD56...
Polynucléaires neutrophiles	CD45, CD15, CD16...
Monocytes	CD45, CD14, HLA-DR...

Tableau 1 : Principaux marqueurs antigéniques utilisés pour l'immunophénotypage des cellules hématologiques

Le signal lumineux émis par la cellule est collecté par un photomultiplicateur transformant le signal optique en signal électronique permettant l'analyse des cellules sur un poste informatique. La cytométrie en flux couplée à l'immunophénotypage permet d'évaluer le nombre, la taille, la structure intra-cellulaire (granularité) mais également les marqueurs antigéniques des cellules (Figure 14).

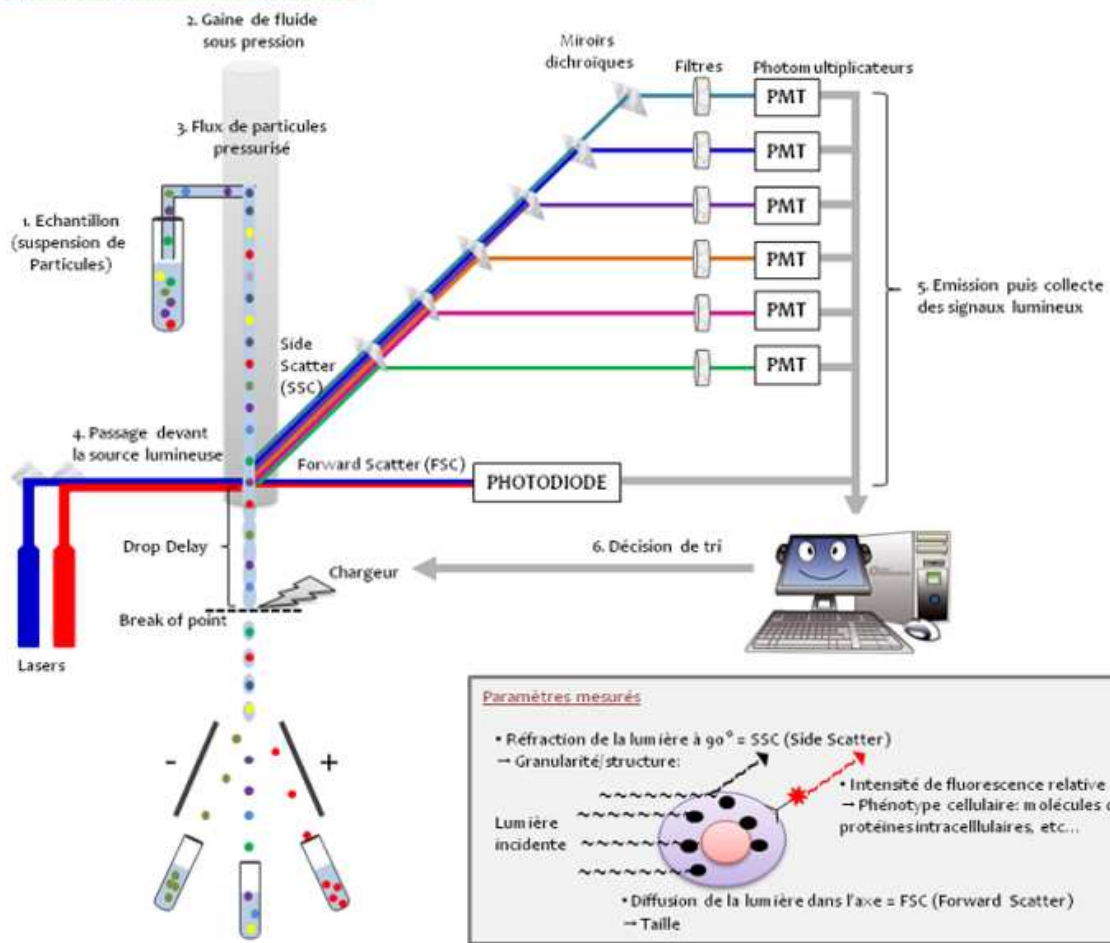


Figure 14 : Principe de la Cytométrie en Flux (90)

Une fois les données collectées, il est nécessaire de réaliser des fenêtrages (ou gating) à l'aide des marqueurs antigéniques d'intérêt pour séparer les populations cellulaires d'intérêt et les analyser (Figure 15).

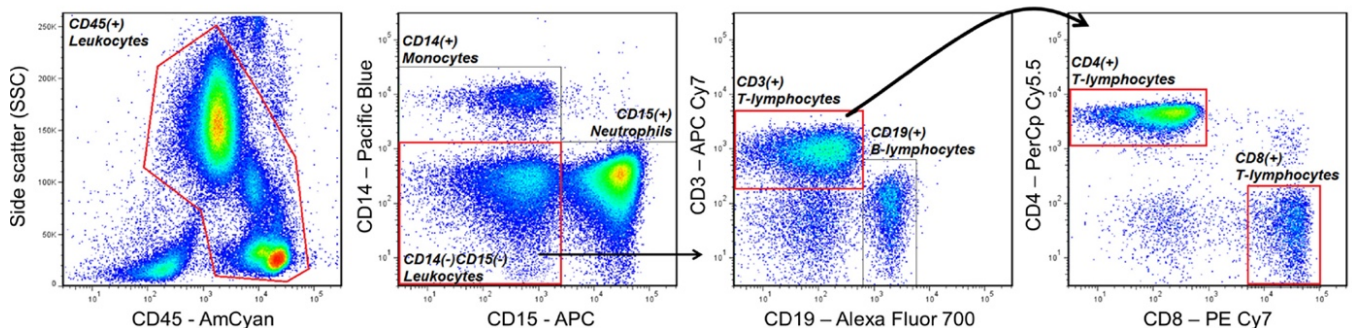


Figure 15 : Exemple de Gating selon Verschoor et al. (89)

Les anticorps couplés aux fluorochromes permettent ainsi de classer les différentes cellules circulantes dans le sang ou dans divers liquides biologiques. L'analyse des lymphocytes circulants est donc possible par immunophénotypage lymphocytaire.

B) Immunophénotypage lymphocytaire

L'immunophénotypage lymphocytaire permet de différencier et de quantifier les principales populations lymphocytaires par l'intermédiaire de marqueurs antigéniques spécifiques. Les lymphocytes T pour thymiques (du fait de leur maturation dans le thymus) expriment le marqueur CD3 et représentent la majorité des lymphocytes circulant chez l'adulte sain (700 à 1900 cellules/ μ l). Les LT exprimant le CD4 représentent 70% des LT circulants, ils sont dits auxiliaires avec pour principal rôle la sécrétion de cytokines (IL-2 puis d'autres cytokines suivant leur polarisation Th1, Th2, Th17...). Les LT exprimant le CD8 représentent 30% des LT circulants et sont dits cytotoxiques (ou CTL pour Cytotoxic T Lymphocyte). Leur rôle est de détruire les pathogènes et les cellules anormales par l'intermédiaire de molécules comme l'IFN- γ , la Perforine et le Granzyme B. On peut également classer les lymphocytes T suivant leur TCR avec une majorité de LT exprimant le TCR $\alpha\beta$ et une minorité de TCR $\gamma\delta$.

Les lymphocytes B pour bone marrow (du fait de leur maturation initiale dans la moelle osseuse) représentent 15% des lymphocytes circulants (100-400 cellules/ μ l). Ils expriment notamment l'antigène CD19 et, après différenciation terminale en plasmocytes, ont un rôle de production d'anticorps circulants (réponse immunitaire humorale) qui se fixent à des éléments reconnus comme nocifs pour l'organisme afin d'entraîner leur destruction. (91)

Les Lymphocytes NK pour Natural Killer représentent 12 à 15% des lymphocytes circulants (100-400 cellules/ μ l) et expriment les marqueurs CD16 et CD56. Ils participent aux mécanismes de défense du système immunitaire inné mais également du système immunitaire adaptatif. (92)

C) Immunophénotypage des CAR-T cells

Il existe 2 techniques permettant d'évaluer la quantité de CAR-T cells dans un échantillon, la PCR (Polymerase Chain Reaction) et la CMF.

La PCR est une technique utilisée en biologie moléculaire permettant d'obtenir une grande quantité d'ADN à analyser. La technique de PCR la plus utilisée pour étudier les CAR-T cells est la PCR digitale (dPCR) qui est plus sensible que l'IPL pour détecter de faibles quantités de CAR-T cells dans un milieu.

La CMF est la 2^{ème} technique permettant de quantifier les CAR-T cells et il existe différentes techniques permettant de suivre les CAR-T cells en CMF. La technique la plus utilisée est également celle qui est mise en place dans notre laboratoire et consiste en un marquage des CAR-T cells par fixation à l'antigène complémentaire du CAR (par exemple le CD19 pour les CAR-T cells anti-CD19) marqué par un fluorochrome. Une amplification du signal peut être réalisée par biotinylation des antigènes (immunocytochimie indirecte), permettant d'augmenter la sensibilité du signal et ainsi être capable de quantifier des CAR-T cells même lors de faibles concentrations dans un milieu. (Figure 16).

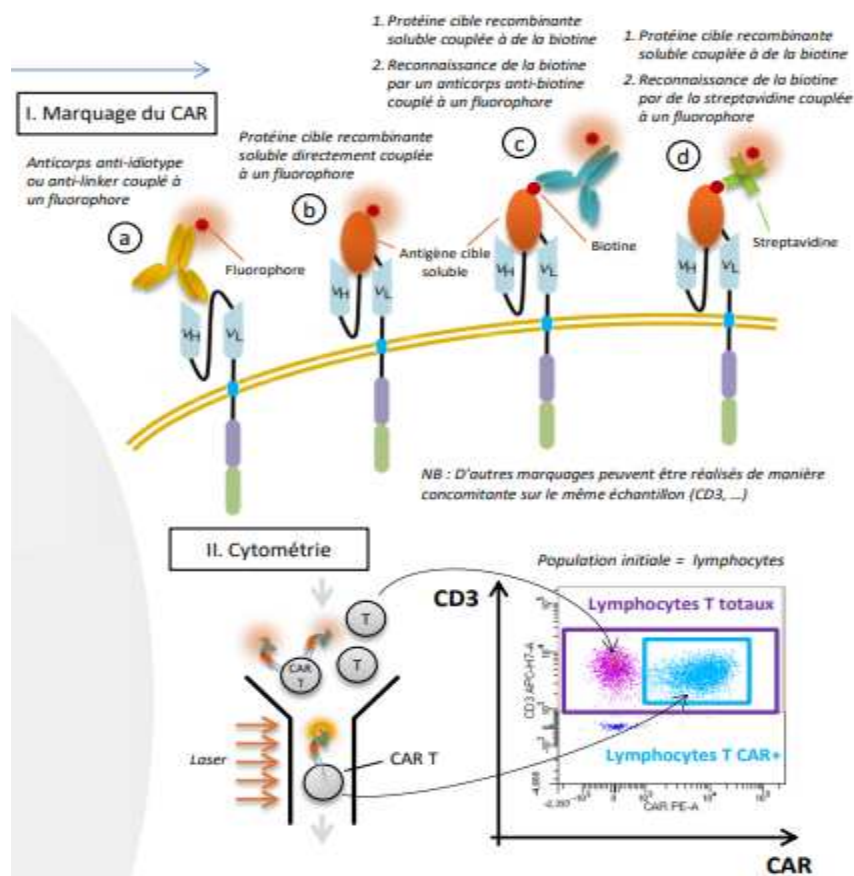


Figure 16 : Méthodes de marquage en Cytométrie en Flux des CAR-T cell selon Rubio et al.(93)

La CMF peut être utilisée pour étudier différents milieux (sang, aphérèse cellulaire, poche de CAR-T cells, Liquide Céphalo-Rachidien). En plus de permettre une évaluation rapide (moins de 24 heures) de la quantité de CAR-T cells, l'IPL permet de typer les différentes populations de CAR-T cells auxiliaires (CD4) et cytotoxiques (CD8) mais également d'évaluer les différentes sous-populations lymphocytaires T à l'aide d'autres marqueurs. (94)

D) Marqueurs des sous-populations lymphocytaires T

En plus des marqueurs CD4 et CD8, on utilise 2 autres marqueurs pour pouvoir analyser les sous-populations lymphocytaires T : CD45RA et CCR7 (CC-chemokine Receptor 7).

a) CD45RA

CD45 est un marqueur dit pan-leucocytaire car présent sur l'ensemble des leucocytes. En revanche, son expression membranaire décroît du lymphocyte au monocyte, avec niveau d'expression faible à la surface des granulocytes et non détectable sur les érythrocytes matures.

(95) Le CD45 est codé par le gène PTPRC (Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type C) situé sur le chromosome 1. L'action du CD45 dépend de sa conformation dans l'espace qui est modulée par épissage alternatif du gène PTPRC par action de la protéine HNPRL (Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein L-Like) (Figure 17). (96,97)

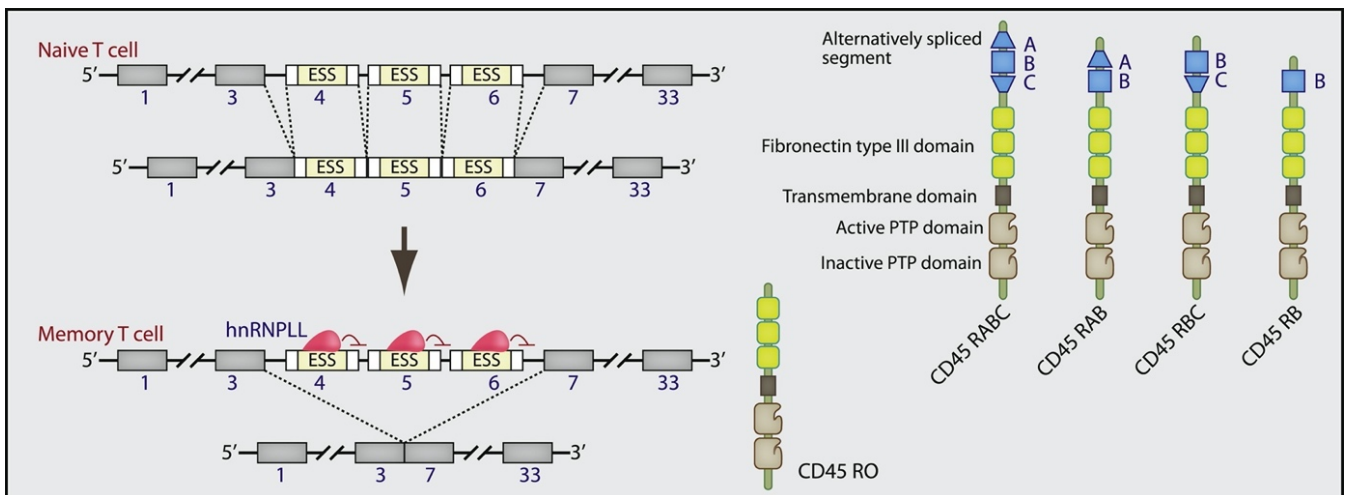


Figure 17 : Épissage alternatif du gène CD45 selon Zikherman et al.(96)

Il existe 2 principaux isotypes de CD45 produits par épissage alternatif et utilisés en CMF pour phénotyper les lymphocytes T :

- CD45RA, protéine de haut poids moléculaire (220 kDa) retrouvée sur le lymphocyte T naïf, n'ayant pas rencontré son antigène d'affinité, mais également sur les lymphocytes de différenciation terminale,

- CD45RO, de plus faible poids moléculaire (180 kDa) marqueur de rencontre du lymphocyte avec son antigène d'affinité. Il est utilisé comme marqueur des lymphocytes dits mémoires. (97–

99) Le CD45 est une protéine phosphatase membranaire, dont le rôle est d'activer le TCR par

déphosphorylation de multiples protéines. Pour activer le TCR, le CD45 déphosphoryle et active la protéine Lck (Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase). La protéine Lck est une protéine kinase dont la forme activée phosphoryle les domaines ITAM du TCR ainsi que la kinase ZAP70 permettant d'initier de multiples voies de signalisation intra-cellulaire (voie des MAP-kinases notamment). Ces voies de signalisation permettront d'augmenter la sécrétion d'IL-2 qui stimulera par action autocrine le CD25, favorisera l'expansion, la survie et la prolifération des LT (Figure 18).

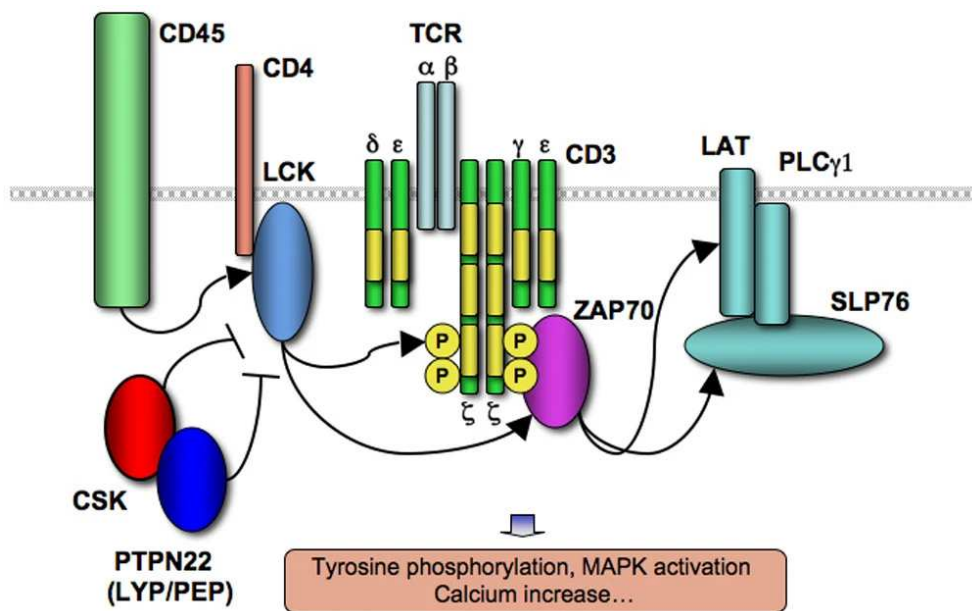


Figure 18 : Rôle du CD45 dans l'activation lymphocytaire T selon Zikherman et al.(100)

Le CD45 joue également un rôle au niveau de plusieurs voies de signalisation intra-cellulaires des cellules myéloïdes avec stimulation de la granulopoïèse en déphosphorylant et activant le récepteur du Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) des cellules myéloïdes. (101,102)

b) CCR7

CCR7 (ou CD197) est un récepteur membranaire couplé à une protéine G situé à la surface de certains lymphocytes T. Son poids moléculaire est de 42,8 kDa et il est codé par le gène CCR7 situé sur le chromosome 17.

C'est un récepteur de cytokines possédant 2 ligands : le CCL19 (CC-chemokine ligand 19) et le CCL21 (CC-chemokine ligand 21) dont le rôle est d'orienter la migration (phénomène de

chimiotaxie) des lymphocytes vers les organes lymphoïdes. (103) (104) En plus du rôle de « homing » ganglionnaire, CCR7 possède de multiples autres fonctions, notamment dans l'angiogenèse et la dissémination des cellules cancéreuses à distance de leur localisation initiale (métastase). (105)

E) Immunophénotypage des sous-populations lymphocytaires T

Les marqueurs CD45RA et CCR7 permettent de classer les lymphocytes T en 4 sous-populations :

- Lymphocyte T naïf, abrégé TN exprimant les marqueurs CD45RA et CCR7,
- Lymphocyte T Central Mémoire, abrégé TCM exprimant les marqueurs CD45RO et CCR7,
- Lymphocyte T Effecteur Mémoire, abrégé TEM exprimant les marqueurs CD45RO et n'exprimant plus le CCR7 (CCR7-),
- Lymphocyte T effecteur terminal ou de différenciation terminale, abrégé TTD exprimant les marqueurs CD45RA et n'exprimant plus le CCR7.

Les proportions de ces 4 sous-populations évoluent au cours du temps et chacune de ces populations possède des capacités de prolifération et d'actions (sécrétion de cytokines, action cytotoxique) qui leur sont propres. (104,106,107)

a) Le Lymphocyte T naïf

Le lymphocyte T naïf (TN) est un lymphocyte qui n'a pas encore rencontré son antigène d'affinité. Il possède une grande capacité de prolifération et une faible activité effectrice une fois activé.

b) Le Lymphocyte central mémoire

Le lymphocyte T central mémoire (TCM) est un lymphocyte qui a rencontré son antigène d'affinité et n'exprime plus le CD45RA. Il présente une durée de vie prolongée, et du fait de l'expression de CCR7, le TCM se positionne au niveau des organes lymphoïdes secondaires en attendant un nouveau contact avec son antigène d'affinité. Le rôle du TCM est d'induire une réponse immunitaire adaptée lors d'un contact subséquent, à distance du premier contact avec l'antigène d'affinité. (108) Il possède une importante capacité de prolifération, d'auto-renouvellement, de sécrétion d'IL-2 et d'IFN- γ mais une faible activité effectrice (médiée par le TNF- α , IL-4, IL-5) et

cytolytique.(109)

c) Le Lymphocyte effecteur mémoire

Le lymphocyte T effecteur mémoire (TEM) tout comme le TCM présente une durée de vie prolongée malgré une faible capacité d'auto-renouvellement. Les Lymphocytes TEM n'expriment plus le CCR7 et circulent dans le sang vers les tissus périphériques au niveau des zones de forte densité en antigènes (poumon, foie, tube digestif). Le TEM possède une activité cytolytique et effectrice plus importante que le TCM avec sécrétion préférentielle d'IFN- γ et réduction de la sécrétion d'IL-2.(110)

d) Le Lymphocyte effecteur terminal

Le lymphocyte T effecteur terminal ou de différenciation terminale (TTD) est un lymphocyte possédant une forte activité cytolytique et effectrice, mais avec une très faible capacité de prolifération. Les TTD expriment de nouveau CD45RA et n'expriment pas CCR7. Les TEMRA sont des LT CD8, intermédiaires entre le TEM et le TTD qui possèdent une forte activité cytolytique du fait d'une plus grande concentration en Perforine et Granzyme B que les autres LT. (111) La différenciation et la répartition des différentes sous-populations lymphocytaires T sont des phénomènes dynamiques et peuvent être ainsi suivis via différents marqueurs en IPL (Figure 19 et Figure 20). (106,112)

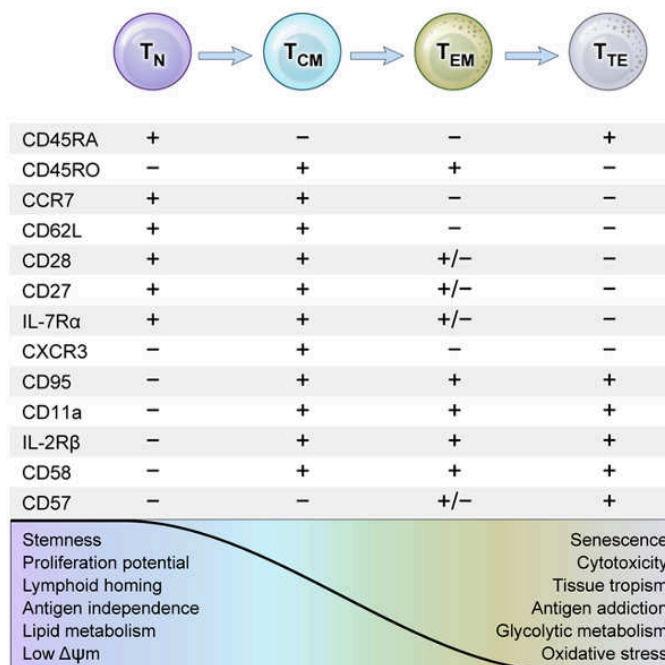
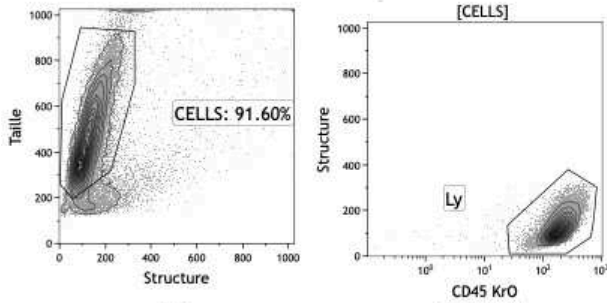
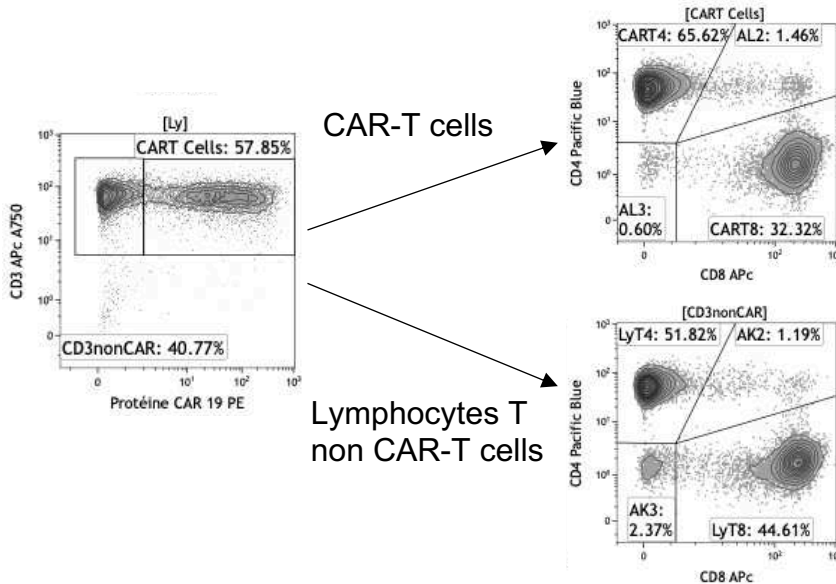


Figure 19 : Différenciation lymphocytaire adapté de Gattinoni et al.(104)

A) Isolement des lymphocytes



B) Isolement des lymphocytes T puis des CAR-T cells, fenêtrage des CD4 et CD8



C) Fenêtrage des sous populations lymphocytaires T pour les CD4 et CD8

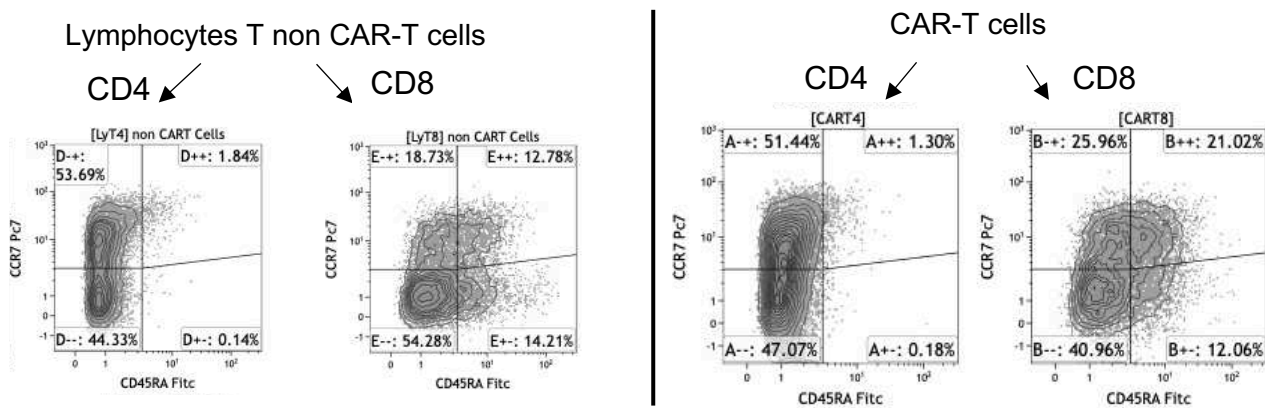


Figure 20 : Exemple d'immunophénotypage lymphocytaire sur poche de CAR-T cells au CHU de Lille

Les cellules à analyser sont classées par taille et structure puis suivant l'expression du marqueur CD45, ce qui permet de sélectionner les Lymphocytes (Figure 20 A). Les Lymphocytes T sont ensuite marqués par l'antigène CD3 puis séparés en populations CAR-T cells et non CAR-T cells suivant leur affinité à l'antigène complémentaire, ici le CD19 (Figure 20 B). Les Lymphocytes T et CAR-T cells sont sélectionnés puis séparés en populations CD4 et CD8 puis en sous-populations lymphocytaires défini selon les marqueurs CD45RA et CCR7 (Figure 20 C)):

- Lymphocytes T naïfs (TN) CCR7+ et CD45RA +, ici population appelée A++ pour les CAR-T cells CD4,
- Lymphocytes T centraux mémoires (TCM) CCR7+ et CD45RA -, ici population appelée A+ pour les CAR-T CD4,
- Lymphocytes T effecteurs mémoires (TEM) CCR7- et CD45RA -, ici population appelée A-- pour les CAR-T CD4,
- Lymphocytes T de différenciation terminale (TTD) CCR7- et CD45RA +, ici population appelée A+- pour les CAR-T cells CD4.

F) Facteurs modifiant le phénotype des lymphocytes T

Les sous-populations lymphocytaires T peuvent être affectées et modifiées par différents éléments :

- Les infections virales chroniques comme le Cytomégalo virus (CMV) et le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) induisent une augmentation du taux de TEM aux dépens du taux de TN. (113,114)
- Les chimiothérapies induisent une diminution du taux de LT immatures (TN et TCM) au profit des LT matures (TEM et TTD). (115,116) Par analogie, on retrouve un taux plus faible de TN dans les poches de CAR-T cells de l'essai ZUMA-1 qui évalue les patients suivis pour LBCL ayant bénéficié d'au moins 2 lignes d'immuno-chimiothérapies en comparaison aux poches de CAR-T cells de l'essai ZUMA-12 qui étudie les LBCL en 1^{ère} ligne de traitement. (117)
- Le vieillissement entraîne une augmentation du taux de TCM CD4 et de TEMRA CD8 aux dépens des populations de TN. (118)
- En comparaison à la population générale ou aux patients atteints de cancers solides, les patients suivis pour un Lymphome Non Hodgkinien (LNH) présentent une augmentation du nombre de TEM avec diminution du nombre de TN. (119) L'analyse de CAR-T cells fabriqués à partir de prélèvements réalisés chez des patients suivis pour une LLC ou une LAL-B retrouve une augmentation de la proportion de TTD, associée à une diminution de l'expansion des CAR-T cells en comparaison aux CAR-T cells issus de prélèvements réalisés chez des donneurs sains. (120)

G) Propriétés des lymphocytes immatures

Les capacités de prolifération et d'activation des lymphocytes immatures exprimant CCR7 (TN et TCM) sont plus importantes que celles des lymphocytes n'exprimant pas le CCR7 (TEM et TTD). Ainsi, on retrouve une meilleure efficacité in vivo et en modèle murin des immunothérapies basées sur les LT immatures. (104,106,112,121–123)

Chez l'homme, les propriétés des sous-populations lymphocytaires T ont été étudiées dans plusieurs domaines :

- Le BLINATUMOMAB est un anticorps bispécifique anti-CD3 et anti-CD19 engageant les LT vers la destruction des cellules exprimant le CD19 dans le cadre de la prise en charge de Leucémie Aiguë Lymphoblastique B. L'efficacité du traitement par BLINATUMOMAB est associée à l'expansion des lymphocytes T après injection et de meilleurs résultats sont obtenus si l'expansion concerne les sous-populations TEM CD8 et TCM CD4. (124)

- Dans le domaine de l'Allogreffe de Cellule souche Hématopoïétique (CSH), les greffons de CSH riches en lymphocytes T immatures (exprimant CCR7) augmentent l'incidence et la sévérité de la maladie du greffon contre l'hôte (Graft Versus Host Disease, abrégé GVHD) aigue en comparaison de greffons pauvres en cellules CCR7. La déplétion du greffon en cellules CCR7 permet de diminuer le risque de GVHD tout en maintenant un effet du greffon contre la leucémie/hémopathie (Graft Versus Leukemia ou GVL). (125–127)

- De nombreuses publications retrouvent une amélioration de l'expansion « in vivo » et une augmentation de la réponse aux CAR-T cells si le produit de leucaphérèse est riche en LT de phénotypes immatures. (38,120,128–133). À l'inverse, si le produit de leucaphérèse est pauvre en cellules immatures, on retrouve une diminution des capacités de prolifération. Cette diminution de capacité de prolifération peut être responsable d'un échec de fabrication des CAR-T cells « in vitro » mais aussi d'une faible expansion « in vivo » avec diminution de la persistance des CAR-T cells dans le temps et une diminution de l'efficacité des CAR-T cells. (115,116,128,134,135) Le risque de CRS et de NT serait diminué chez les patients réinjectés par CAR-T cells issus de produits riches en cellules immatures. (74,136)

Le principal CAR-T cell utilisé au CHU à Lille est Axi-cel qui représente 43% de l'ensemble des CAR-T cells réinfusés. Le Lymphome B Diffus à Grandes Cellules (abrégé DLBCL) représente la principale hémopathie prise en charge avec 62% de l'ensemble des hémopathies. Quatre-vingt-dix-sept pourcents des patients traités par Axi-cel ont été pris en charge pour un DLBCL.(Figure 21)

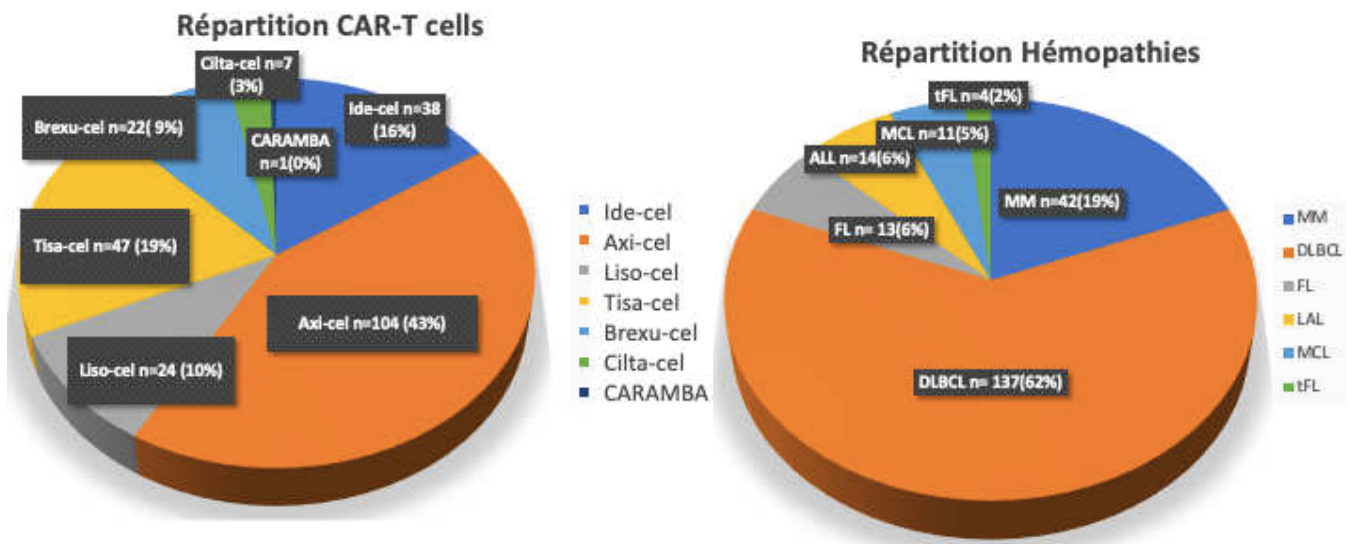


Figure 21 : Répartitions des CAR-T cells et des hémopathies réinjectées par CAR-T cells au CHU à Lille

Abréviations : DLBCL, Lymphome B diffus à Grandes Cellules ; FL, Lymphome Folliculaire ; LAL, Leucémie Aiguë Lymphoblastique B ; MCL, Lymphome du Manteau ; MM, Myélome Multiple ; tFL, Lymphome Folliculaire Transformé.

III. Lymphomes B Diffus à Grandes cellules

A) Généralités et épidémiologie

Les Lymphomes B diffus à Grandes cellules sont des néoplasies caractérisées par un envahissement par une prolifération tumorale composée de grands lymphocytes B. L'incidence des DLBCL est estimée à 5581 cas par an en France. (137,138) Parmi ces nouveaux cas, 3140 cas estimés chez l'homme et 2441 chez la femme, soit un sex-ratio à 1,28 de prédominance masculine. L'âge médian au diagnostic est de 71 ans en France, mais il existe également des formes pédiatriques. (139) (140) La survie nette liée à la maladie est estimée à 63 % à 5 ans du diagnostic, avec une surmortalité chez les sujets âgés par rapport aux sujets jeunes. (141) Cette survie est également impactée notamment par les différents sous types histologiques de DLBCL. (142)

B) Classification

Les DLBCL font partie de la famille des Lymphomes B à Grandes Cellules (LBCL) présentés dans la 5^{ème} édition de la classification de l'OMS des tumeurs lymphoïdes révisée en 2022 (Tableau 2).

Lymphomes à Grandes cellules B

- Lymphomes B diffus à Grandes cellules, NOS (Not Otherwise Specified)
- Lymphome B à Grandes Cellules riches en T ou en histiocytes
- DLBCL/ Lymphome B de haut grade avec réarrangement de MYC et BCL2
- Lymphome B à grandes cellules ALK positif
- Lymphome B à grandes cellules avec réarrangement IRF4
- Lymphome B de haut grade avec anomalies 11q
- Granulomatose Lymphomatoïde
- Lymphome B diffus à grandes cellules EBV-positif
- Lymphome B diffus à grandes cellules associé à une inflammation chronique
- Lymphome B à grandes cellules associé à la fibrine
- Lymphome B à grandes cellules associé aux œdèmes
- Lymphome Plasmablastique
- Lymphome B à grandes cellules primitif des sites immuno-privilegiés
- Lymphome B diffus à grandes cellules, type jambe
- Lymphome B à grande cellule intravasculaire
- Lymphome B primitif du médiastin
- Lymphome de la zone grise Médiastinale
- Lymphome B de haut grade, NOS (Not Otherwise Specified)

Tableau 2 : Principaux sous types de LBCL selon la classification OMS 2022

Les LBCL représentent un ensemble de pathologies proches mais possédant des différences histologiques, clinico-biologiques, génétiques responsables de pronostics variés. Il est donc nécessaire d'adapter la prise en charge devant l'hétérogénéité de ces pathologies de pronostics différents. (143–146)

C) *Traitement*

Le traitement de 1^{ère} ligne des DLBCL consiste le plus fréquemment en une immuno-chimiothérapie de type CYCLOPHOSPHAMIDE-DOXORUBICINE-VINCRISTINE-PREDNISONNE ou CHOP (147), associée au RITUXIMAB, un anticorps monoclonal anti-CD20. L'évaluation initiale et la réponse au traitement sont évaluées par Tomographie par Émission de Positron couplée au scanner (TEP-TDM) utilisant le 18 Fluoro-Désoxy-Glucose (FDG) comme marqueur, à l'aide des critères de DEAUVILLE. (148) Ce schéma R-CHOP permet d'obtenir une guérison chez 65 à 70% des patients. (149–151)

Le pronostic reste péjoratif chez les patients en rechute précoce (< 12 mois du début du traitement) ou réfractaires à une première ligne de traitement. En effet, 30-40% de ces patients répondent au traitement de rattrapage (151–154) et 50% des patients autogreffés rechutent, avec une survie globale estimée entre 4 et 6 mois. (151,155,156) C'est dans cette population de patients réfractaires primaires ou en rechute précoce que les CAR-T cells ont permis une amélioration significative de la survie sans progression. Ainsi, les CAR-T cells occupent désormais une place importante dans la prise en charge des DLBCL réfractaires primaires ou en rechute précoce (Figure 4). (24,31,157)

Algorithm for Second-line Therapy of LBCL

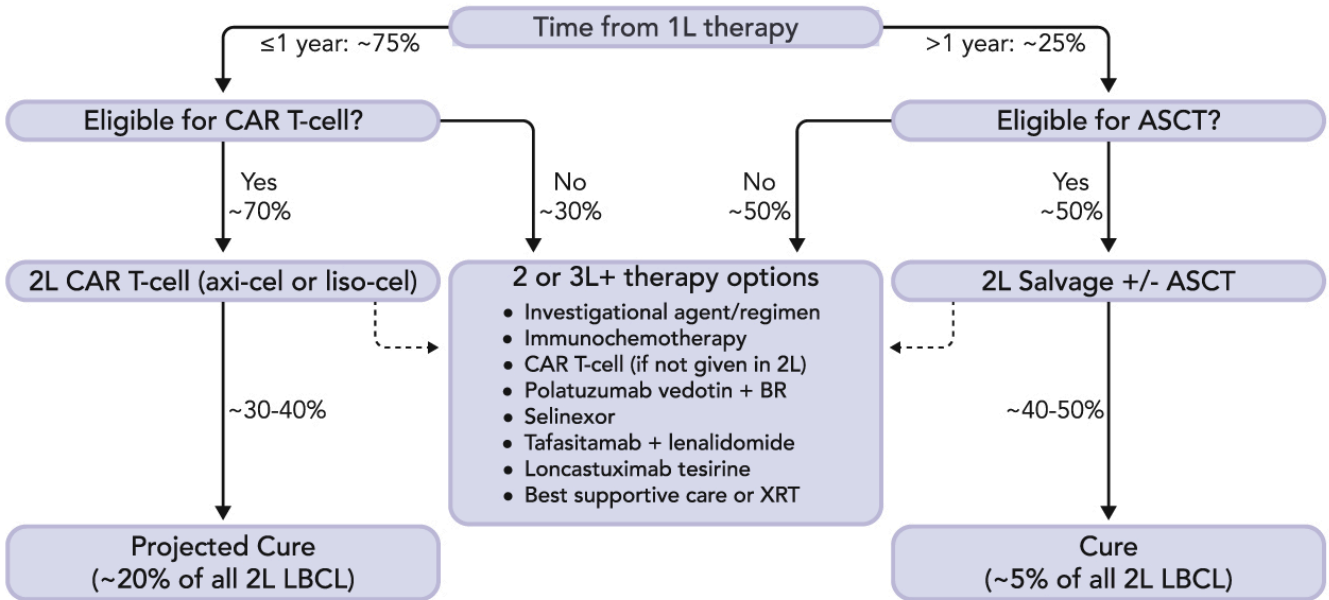


Figure 22 : Traitement de 2^{ème} ligne des DLBCL à l'ère des CAR-T cells selon Westin et al. (158)

IV. Rationnel de l'étude

Comme expliqué précédemment, les CAR-T cells sont produits à partir de lymphocytes T issus d'un prélèvement de leucaphérèse suivi de plusieurs étapes de modification et d'activation cellulaire permettant l'obtention du produit final. Ainsi, les caractéristiques de ce médicament varient d'un patient à l'autre du fait des étapes d'activation lors de la production (transduction, expansion in vitro), mais également en raison des différences interindividuelles liées à l'âge, l'hémopathie, aux différents traitements d'immuno-chimiothérapies préalables et aux expositions virales.

L'immunophénotypage lymphocytaire permet d'évaluer le degré de maturation lymphocytaire et rend possible une quantification in vitro et vivo. Cet examen pourrait être un outil permettant d'appréhender les variations interindividuelles et de suivre l'évolution des différentes sous-populations lymphocytaires T, du produit de leucaphérèse à la poche de CAR-T cells réinjectée. Il pourrait avoir un intérêt prédictif dans la réponse et la tolérance au traitement.

V. Objectifs

Notre objectif principal est d'évaluer si un produit de leucaphérèse riche en lymphocytes T immatures permet d'augmenter la transduction des CAR-T cells.

Nos objectifs secondaires sont d'évaluer les liens entre les sous-populations lymphocytaires des produits de leucaphérèse, de la poche CAR-T cells et des CAR-T circulants avec l'efficacité et la tolérance des CAR-T cells.

ARTICLE

Respectant le format « thèse d'article », la section suivante est issue d'un manuscrit en langue anglaise.

T-cell Immunophenotyping applied to the use of CAR-T cells, A monocentric retrospective study

Guillaume Chanteau¹, Paul Chauvet¹, H el ene Behal⁴, Nicolas Robillard⁴, David Beauvais^{1,3}, Julie Demaret^{2,3} and Ibrahim Yakoub-Agha^{1,2,3}

1- CHU de Lille, Maladies du Sang, Univ Lille, 59000 Lille, France

2- CHU de Lille, Institut d'Immunologie, Lille, 59000 France

3- CHU de Lille, Univ Lille, INSERM U1286, Infinite, 59000 Lille, France.

4- CHU de Lille, Maison R egionale de la Recherche Clinique, Lille 59037, France

Corresponding author: Guillaume Chanteau and Paul Chauvet

Running title: T-cell Immunophenotyping applied to the use of CAR-T cells, a monocentric retrospective study

N o of words: 6437

N o of tables: 6

N o of figures: 4

Key words: CAR-T cells, Flow Cytometry, DLBCL, Myeloma, Non-Hodgkin Lymphoma, Immunophenotyping, Naive T cells, CCR7, CD45RA, CD45RO, CRS, ICANS

Abstract

Introduction:

CAR-T cell therapy dramatically improved the prognosis of many refractory or relapsing hematologic B cell malignancies. However, effectiveness and tolerance are heterogeneous between patients. Patients receiving CAR-T cell therapy experience toxicities such as Cytokine Releasing Syndrome (CRS) and Neurotoxicity (NT). CAR-T cells are manufactured from T cell leukapheresis. These cells can be analyzed using T cell immunophenotyping to describe its heterogeneity. Our objective is to evaluate T cell phenotype to predict transduction, response, and tolerance of CAR-T cell therapy.

Method:

We conducted a single-center retrospective analysis in patients who received CAR-T cell therapies in Lille University Hospital. We studied T cell subsets according to 4 different markers (CD4, CD8, CCR7, CD45RA) in leukapheresis and CAR-T cell final product. We also measured in vivo CAR-T cell Peak and CAR-T cell level 7 days after infusion. Cohort I included all analyzable patients, Cohort II included analyzable patients for T cell subsets on both leukapheresis and CAR-T cells product, Cohort III included patients treated with Axi-Cel. Comparisons were made by bilateral test and significant threshold set at 5%. Progression-free survival were estimated by Kaplan-Meier method.

Results:

Eighty-one patients treated by several CAR-T cells were included.

Cohort I evaluated these 81 patients biologic characteristics. We measured a median transduction rate of 65.4%, which is not correlated with any immature T cell subset in leukapheresis after

analyses. Cohort III evaluated 32 patients, and we highlighted an association between CD4 TN in leukapheresis and the risk of grade > 1 CRS ($p = 0.01$) as well as those CD4 TN with a CAR-T level on day 7 ($p = 0.007$). CAR-T level on day 7 was significantly associated with occurring grade >1 CRS ($p=0.006$). CCR7 CD8 T cells from leukapheresis were significantly associated with the risk of Grade>2 anemia ($p=0.03$). No leukapheresis subset was associated with the CAR-T cell response or transduction rate.

Conclusion:

Leukapheresis immature T cell subset is not predictive of enhanced Transduction rate or CAR-T cell response but could be used as a predictive marker for grade >1 CRS (naive CD4 LT) and grade >2 anemia (CD8 CCR7 LT).

Introduction

CAR-T cell therapy dramatically improved the prognosis of many refractory hematologic B malignancies. Six different CAR-T cell therapies have been approved until now. Axi-cel, Tisa-cel, Liso-cel, and Brexu-cel are anti-CD19 CAR-T cell therapy developed against B cell malignancies, while Ide-cel and Cilta-cel target BCMA in Multiple Myeloma.(1–10). Despite a good response rate, some patients relapse or progress after treatment. Another challenge in the CAR-T cell domain is specific toxicities like Cytokine Releasing Syndrome (CRS) and Neurotoxicity (NT) that occur in the early stages of the follow-up.(11–14) These toxicities need to be predicted to set specific management and avoid extending hospitalization or even death. (14,15)

As CAR-T cells is a human medication derived from T cells, we hypothesize that individual variation in T cell phenotype can lead to different manufacturing properties and clinical outcomes. (16–19) Thanks to flow cytometry, T cells can be divided into four subsets regarding proliferative capacity based on the expression of CCR7 and CD45A: Naïve (TN), Central memory (TCM), Effector Memory effector (TEM), differentiated T cell (TTD). (20–22). In many adoptive cellular therapy centers, including ours, flow cytometry is routinely used, but data are lacking to strongly support CAR-T cell monitoring. (23) Few studies showed that CD8 TN and TCM in the leukapheresis product are associated with a better response rate. However, knowledge regarding the association between tolerance and the T cell subset is limited or can be inconsistent (24–27). Naive or immature T cells in the leukapheresis product are thought to improve the efficacy of T cell-derived therapies while enhancing their toxicities. (22) In other adoptive T cell therapy domains like allogeneic stem cell transplantation, our team showed that CCR7 T cells in the graft product is linked with a higher incidence and gravity of Graft Versus Host Disease (GVHD). (28,29)

We designed here a single-center study to determine if immunophenotyping can help physicians predict outcomes and manage patients undergoing CART cell therapy.

Methods

Patients and data collection

We conducted an observational, monocentric retrospective study between July 2018 and May 2023 on patients who received CAR-T cell therapy for a hematologic malignancy at Lille University Hospital.

At first, we included all patients who could be analyzed for their leukapheresis and CAR-T cell product by flow cytometry. We named this cohort, Cohort I.

From cohort I, we isolated two subgroups:

- Cohort II included all patients from Cohort I who could be analyzed for both T cell subsets on leukapheresis and CAR-T cell products by flow cytometry. This cohort was made to follow T cell subset evolution throughout the manufacturing process.
- Cohort III included all Axi-cel patients (Cohort III) from Cohort I. This cohort was made to evaluate clinical outcomes like response and tolerance. We followed patients from the 1st of October 2022 to the 16th of May 2023.

All patients were over 18 years old and provided written informed consent for the use of their data for clinical research in the CAR-Lille study (Supplemental Figure I). This research was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

Staging, response, and toxicity assessment

According to local guidelines, patients were evaluated by 18-Fluoro-Deoxy-Glucose Positron Emission Tomography (18-FDG PET) at 1 month, 3 months, 6 months, and 12 months after CAR-T cell reinfusion. An interim evaluation was also made if there was a suspicion of disease progression at a different moment of the follow-up. A Magnetic Resonance Imaging (MRI) with gadolinium injection follow up was also made if there was a Central Nervous System (CNS) involvement measurable by the MRI. Response assessment was made following the DEAUVILLE scale and LUGANO criteria. Cytokine Releasing Syndrome (CRS) and Neurotoxicity (NT) were

classified according to the American Society for Transplantation and Cellular Therapy (ASTCT) consensus grading score. Cytopenias were classified according to the Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE 5.0). C Reactive protein (CRP), fibrinogen and ferritin were dosed one day before leukapheresis, the day of CAR-T cell infusion, and then every 2 days, or if there was CRS or NT suspicion.

FlowCytometry staining and characterization of lymphocytes

The Characterization of the leukapheresis product, the CAR-T cell product, and post-infusion evaluation of blood samples were performed using the Navios™ flow cytometer and NAVIOS software (Beckman Coulter).

Flow cytometry data acquisition was made from different sources :

- 1 ml of leukapheresis product, collected on the day of the leukapheresis,
- 500 µl of washed CAR-T cell infusion bag, collected on the day of the CAR-T cell reinjection.

Transduction rate is defined by the ratio of CAR-T cells above all CD3 cells in the CAR-T cell product.

- 100 µl from blood samples collected in EDTA tubes, 7 days (D7) after CAR-T cell infusion, and at any time point if there were clinical events of interest (CRS grade > 1, NT). The CAR-T cell peak represents the maximal rate of CAR-T cells observed at any time during the hospitalization.

From each source of T cells, cell counting was performed using microbeads (Flow-Count™ Fluorospheres, Beckman Coulter, Brea, California). The number of cells was adjusted to $2 \cdot 10^6$ cells per milliliter for the staining process. The staining procedure was different for leukapheresis and CAR-T cell infusion bags versus blood samples.

For leukapheresis and CAR-T cell infusion bags:

Cell suspensions were stained with Krome Orange (KrO)-labeled anti-CD45 (J33), Allophycocyanin (APc)-labeled anti-CD8, Pacific Blue (Pac)-labeled anti-CD4, Phycoerythrin

(Pe)-Cyanin 7 (Pc7)-labeled anti-CD3 or CD3-Fitc (UCHT1), CD19-Pc5.5 (J3–119), CD16-PE (3G8), CD56-Pe (N901), CD45RA-Fitc (ALB11), and CCR7-PE (G043H7) and the last antibody was the CAR-T marker. All reagents were purchased from Beckman Coulter.

Then, the CAR-T cell staining process was different for anti-BCMA CAR-T cells and anti-CD19 CAR-T cells. Anti-BCMA CAR-T cell staining was performed using Fluorescein (FITC)-labeled human BCMA protein (#BCA-HF2H1, Acro Biosystems). Briefly, cell suspensions were incubated with antibodies and FITC-labeled protein for 20 minutes and were washed twice with (PBS) before analysis.

Anti-CD19 CAR-T cell staining was performed using FITC-labeled human CD19 protein with a direct procedure (PE-CD19 protein from Acro Biosystems - Fc Tag, #CD9-HP254) or indirect staining (CD19 CAR Detection Reagent from Miltenyi Biotec - #130–115-965, Germany) to enhance sensibility.

For blood samples:

The same antibody cocktail was automatically distributed on 100 µl of blood with Beckman Coulter PrepPlus2.

For direct staining: lyophilized FITC-CD19 protein is reconstituted with sterile deionized water containing 0.1% bovine serum albumin (BSA) to obtain a stock solution of 100 µg/ml. 5 µl aliquots are prepared and stored at –80°C. We used 2.5 µl of labeled FITC-CD19 protein for staining, or FITC-BCMA. Blood samples were incubated with antibodies and FITC-labeled protein for 20 minutes and then lysed using the Immunoprep Reagent System on the Beckman Coulter TQ-Prep. Samples were washed two times with PBS before analysis.

For indirect staining: blood samples were first incubated with 2 µl of the CD19 CAR detection reagent (biotin) for 10 minutes at room temperature and washed twice with PBS. Suspensions were incubated with other staining antibodies and 2 µl of anti-biotin-PE antibody (#130-111-068, Miltenyi Biotec) for 10 minutes. Red blood cells were then lysed with 1 ml of Versalyse Lysing

solution (Beckman Coulter, USA) and washed twice with PBS before analysis.

Samples were incubated with the antibody cocktail for 10 min and then lysed using the Flow-count fluorospheres were loaded and acquired simultaneously with the cells to determine the absolute cell counts of the CD3+ T cell subset.

The fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies used were: CD45- KrO (J33), CD3-Fitc (UCHT1) or Pc7-labeled anti-CD3, CD19-Fitc (20-291) or BCMA-FITC (BCA-H2F1), CD4-PacB (13B8.2), CD8-APC (5FC121TH42D*3), CD19-Pc5.5 (J3-119), CD16-PE (3G8), CD56-Pe (N901), CD45RA-Fitc (ALB11), and CCR7-PE (G043H7) and the last antibody was the CAR-T protein CD19-Fitc (20-291) or BCMA-FITC (BCA-H2F1) for direct staining or CD19 CAR Detection Reagent from Miltenyi Biotec (#130-115-965, Germany) for indirect staining. All reagents were purchased from Beckman Coulter except for CAR-T cell staining with FITC-BCMA protein (#BCA-HF2H1) and FITC-CD19 protein (#CD9-HF2H2) from Acro Biosystems (Newark, Delaware, USA) and CAR 19 Detection Reagent (#130-115-965) from Miltenyi Biotec Germany.

(23)

Flow cytometry gating procedure

Flow cytometry data analysis was performed using Kaluza software (Beckman Coulter) and cytometer performances were checked daily using quality controls (Flow-set fluorospheres and Flow-check fluorospheres, Beckman Coulter). We excluded doublets and gated lymphocytes based on both side scatter (SSC) and CD45 expression. T cell subsets were identified according to a combination of CCR7-PE/CD45-KrO/CD3-FITC/CD4-APc/CD8-Pac expressions. Among CD4+ or CD8+ T cells and CAR-T cells, subsets were identified based on CCR7 and CD45RA expressions, as follows:

- Naive T cells (TN) with CD45RA+ and CCR7+,
- Central Memory T cells (TCM) with CD45RA- and CCR7+,
- Effector Memory T cells (TEM) CD45RA- and CCR7-,
- Mature T cells or Terminally differentiated T Cell (TTD) CD45RA+ and CCR7-.

For CAR-T cell gating, anti-CD19 CAR T-cells were identified as cells expressing both CD3 and CD19-FITC protein, or CAR 19 Detection Reagent. Anti-BCMA CAR T-cells were identified as cells expressing both CD3 and BCMA-FITC proteins. The proportion of CD4 positive and CD8 positive cells was evaluated among the CAR T-cell subset and the non-CAR-T cell subset. Based on the CD3+ lymphocyte absolute count and percentages of CAR T-cells among CD3+ lymphocytes in the second panel, absolute counts for each subset were calculated.

B cells were identified by CD19 expression and NK cells by CD16-PE and CD56-PE expression.

Statistical analysis

Qualitative variables were described as frequencies and percentages. Gaussian numeric variables were described as mean and standard deviation (SD), non-Gaussian numeric variables were described as median and interquartile range [IQR]. Normality of numeric variables were graphically verified and tested with Shapiro-Wilk test. Comparisons between groups of patients were made with the Chi-Square test or Fisher exact test (when the Chi-Square test is not verified) for qualitative values, the Student t-test for gaussian numeric values, with Mann-Whitney U test for non-Gaussian numeric values. The correlation between two numeric variables was made with the Spearman correlation coefficient. Overall Survival and Progression free survival were estimated with Kaplan-Meier Method and compared with the Log-Rank test. Bilateral tests were made with a significance level of 5%. Statistical analyses were performed by the Biostatistics and Methodology Unit of Lille University Hospital using SAS (SAS Institute version 9.4).

Figure representation

Figures were generated with SAS (SAS Institute version 9.4), GraphPad Prism 9 and EasyMedStat (version 3.28).

Results

1) Distribution of Patients

231 patients had been infused with CAR-T cell therapy at Lille University Hospital between the 3rd of September 2018 and the 24th of May 2023. We selected every patient who was evaluated by flow cytometry for leukapheresis and the CAR-T cell final product (Figure 1).

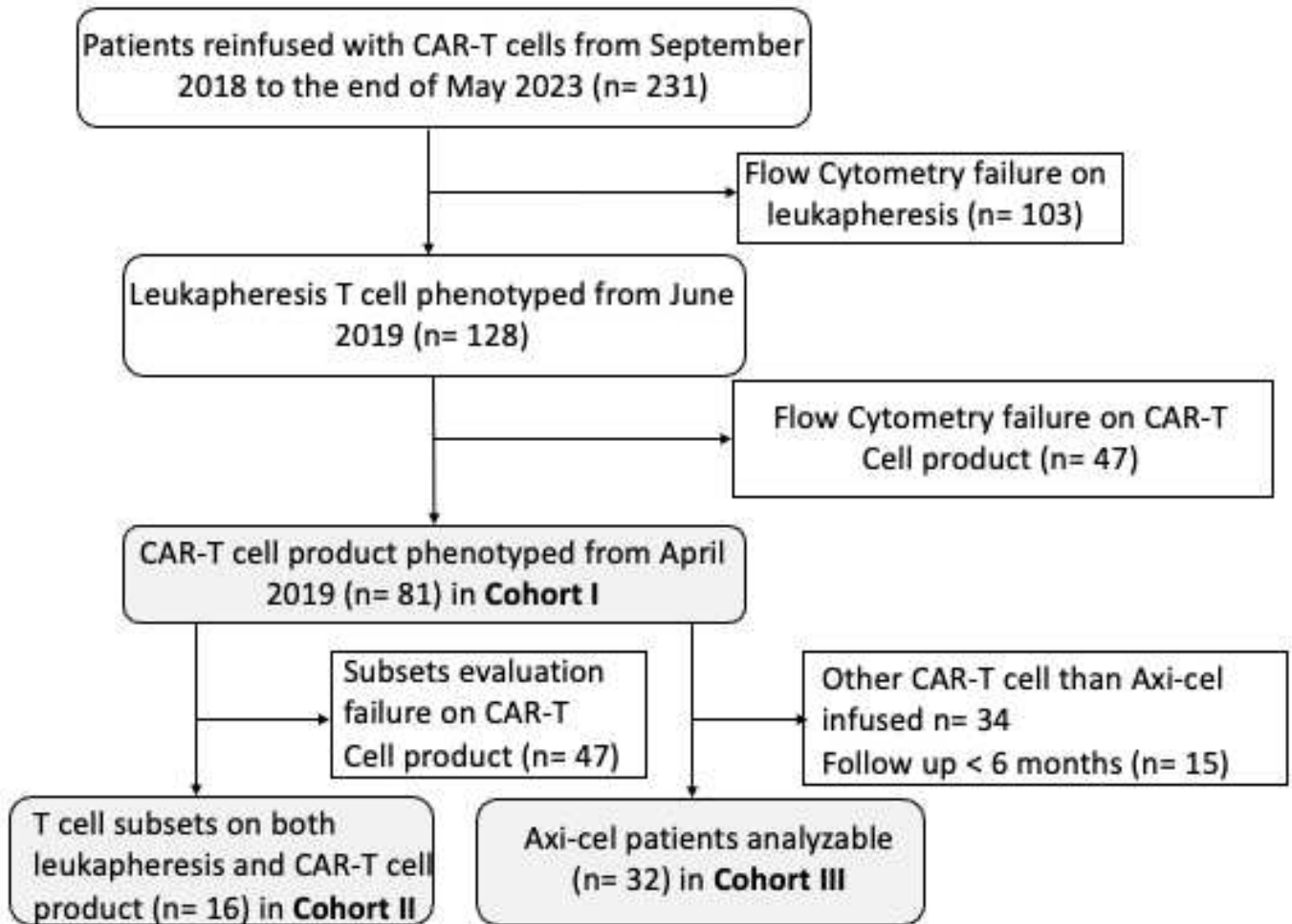


Figure 1 : Flowchart

2) Leukapheresis T cell subsets do not correlate with Transduction rate

Cohort I included 81 patients, with 14 treated for Multiple Myeloma (11 Ide-cel and 3 Cilta-cel), 43 with Diffuse Large B Cell Lymphoma (or DLBCL with 36 Axi-cel and 7 Tisa-cel), 11 with Transformed Follicular Lymphoma (11 Axi-cel), 5 with Follicular Lymphoma (5 Tisa-cel), 8 with Mantle Cell Lymphoma (8 Brexu-cel) (Supplemental Table IA, IB, IC, ID, IE).

In the leukapheresis product, the median T cell was at 85,3% [IQR 75,2-90,4%] of all lymphocytes. CD4 and CD8 T cell medians were respectively at 39,3% [IQR 31,5-52,1%] and 38,4% [IQR 30,8-48,2%] of T cells.

In the CD4 population, the TL median was 11,6% [IQR 5,4-23,1%] for TN, 44,3% [IQR 30,7-54,7%] for TCM, 76,2% [IQR 61,2-94,3%] for CCR7 CD4 T cells, 31 % [IQR 21,5-49,3%) for TEM, and 2,2 % [IQR 1-4,7%] for TTD. In the CD8 population, the TL median was 12,3% [IQR 5,6-22%] for TN, 7,4% [IQR 3,8-13,9%] for TCM, 33,3% [IQR 23,2-77,2%] for CCR7 CD8 T cells, 21,3 % [IQR 15,7-34,6%] for TEM, and 48,2% [IQR 35,3-63,7%] for TTD (Figure 2).

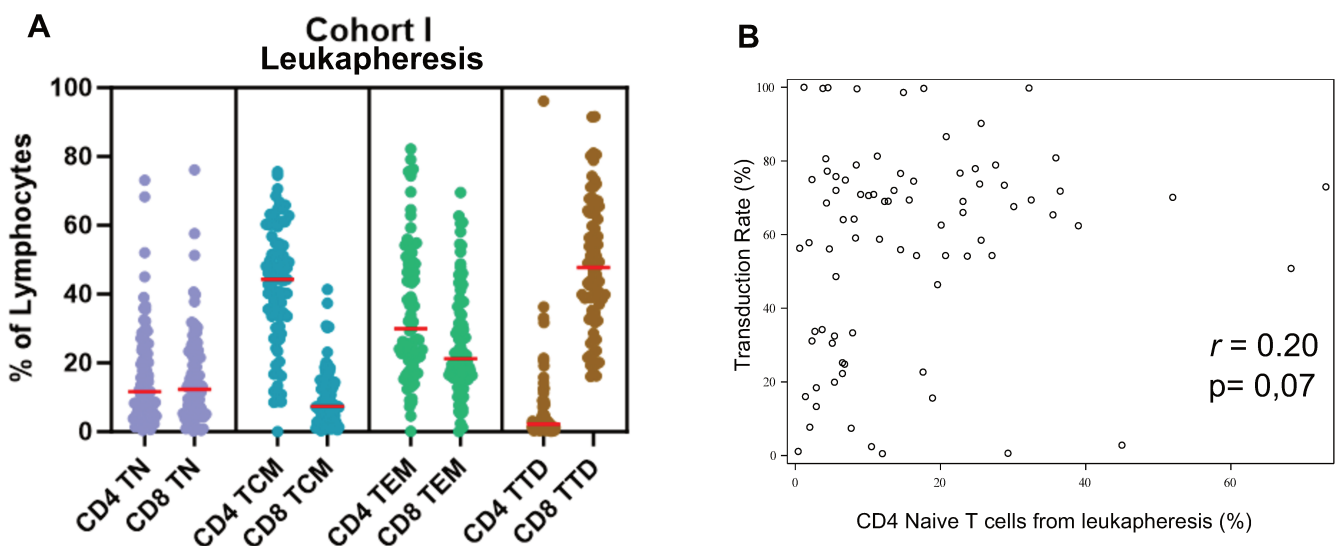


Figure 2 : Leukapheresis T cell repartition in Cohort I (A) Dot plot represents T cell subset repartition in leukapheresis for Cohort I (TN in purple, TCM in turquoise, TEM in green, and TTD in brown). Red bars indicate medians for each subset. (B) Scatter plot corresponding to correlation between CD4 naive T cells in leukapheresis and Transduction date in cohort I. Abbreviations: TCM, Central Memory T cell; TEM, Effector Memory T cell; TN, naive T cell; TTD, Terminally Differentiated T cell.

In the CAR-T cell product, the median Transduction rate was 65,36% [IQR 33,7-74,8%] of T cells, with 50,9% [IQR 36,4-74,1%] CD4 median and 39,8% [IQR 20,1-59,9%] CD8 median of CAR-T cells (Supplemental Tables IIA and IIB).

The Spearman Correlation Test showed no correlation between the Transduction rate and any CCR7 + T cell sub-population from leukapheresis: TN CD4 ($r = 0.20$, $p = 0.07$), TCM CD4 ($r = 0.07$, $p = 0.53$), CCR7 CD4 ($r = 0.16$, $p = 0.14$), TN CD8 ($r = 0.04$, $p = 0.74$), TCM CD8 ($r = - 0.10$, $p = 0.37$) or CCR7 CD8 ($r = - 0.05$, $p = 0.68$). There is also no correlation between the rate of immature T cells superior to the median in the leukapheresis product and the Transduction rate (Supplemental Table IIC).

3) T cell subset evolution following manufacturing

Cohort II included 16 patients, with 12 treated for DLBCL, 2 with Follicular Lymphoma, and 2 for Transformed Follicular Lymphoma. Twelve of them received Axi-cel and, four received Tisa-cel (Supplemental Table IG). The median Transduction rate was 63,9% [IQR 32,9-73,4%] of T cells. Median CD4+ and CD8 CAR-T cells were respectively 49,9% [IQR 28,9-68,4%) and 47,3% [IQR 29,7-67,7%] of all CAR-T cells. From Leukapheresis product to CAR-T cell product, T cell and CAR-T cell subsets median were distributed as follows:

- For CD4 T cell median, TN declined from 8,1% [IQR 4,9-22,8%] to 1,42% [IQR 1,2-2,2%], TCM rose from 49,9 % [IQR 43,1-60,7%] to 55,1% [IQR 34,7-74,5%], TEM rose from 25,8% [IQR 17,8-44,2%] to 44,5% [IQR 24,2-60,2%], TTD declined from 1,9% [IQR 0,7-3,8%] to 0,3% [IQR 0,04-0,9%] of CD4 T cells (Figure 3A),

- For CD8 T cell median, TN declined from 14,6% [IQR 6,1-24,2%] to 6,4% [IQR 3,4-10,6%], TCM rose from 9,5 % [IQR 7,1-13,5%] to 35% [IQR 21,7-44,8%] TEM rose from 20,1% [IQR 17,2-28,2%] to 46,2 % [IQR 33,2-60,7%], TTD declined from 46,7% [IQR 37,2-56,4%] to 2,3% [IQR 0,6-9,2%] of CD8 T cells (Figure 3B) (Supplemental Tables IIIA, IIIB).

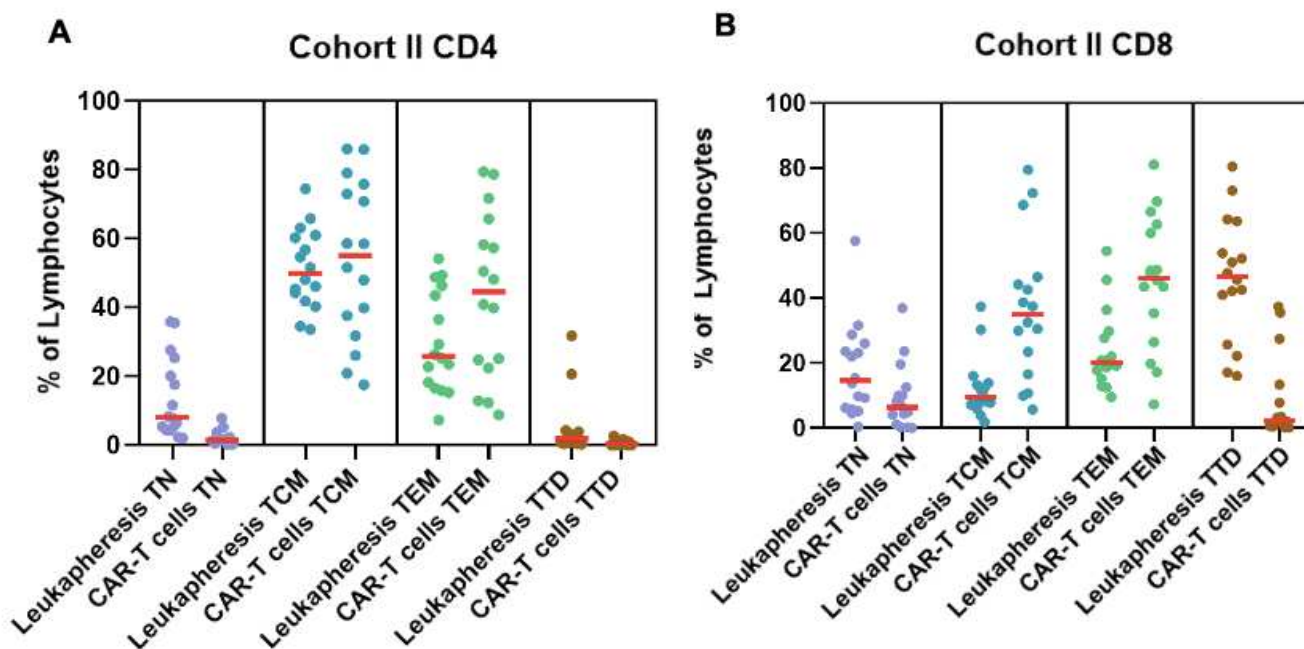


Figure 3 : Leukapheresis and CAR-T cell repartition in Cohort II. (A) CD4 subsets are represented in dot blot (TN in purple, TCM in turquoise, TEM in green, and TTD in brown). (B) CD4 subsets are represented in a dot blot with red bars indicating each subset median. Both figures show a rise in memory T cells (TCM and TEM) and a decline in the TN and TTD subsets.

Abbreviations: TCM, Central Memory T cell; TEM, Effector Memory T cell; TN, naive T cell; TTD, Terminally Differentiated T cell.

4) Clinical outcomes and T cell phenotype in Axi-cel infused patients

Cohort III included 32 patients, treated by Axi-cel for Non-Hodgkin Lymphoma. There were 10 women (31,3%) and 22 men (68,8%). Twenty patients (62,5%) had a Performance Status score of 0. The median age was 55 years [IQR 41-65%]. Three patients were in complete response (CR), five were in partial response (PR), one patient was in stable disease (SD), and 23 were progressive before infusion. Twenty-three patients had Lactate Dehydrogenase (LDH) above normal. Seventeen patients received more than two lines of therapy. None of them previously received stem-cell transplantation (autologous or allogeneic stem-cell transplantation). Fifteen patients had positive CMV serology. The mean delay between leukapheresis and CAR-T cell infusion day was 33,5 days (range was 27 to 64 days). Cohort III patient characteristics are reported in Table 1.

Characteristics	Number of patients n= 32
Median Age, years [IQR]	55 [41-65]
Performance Status n(%)	
0	20 (62.5%)
1	12 (37,5%)
Male sex n(%)	22 (68.8%)
Sub-type n(%)	
DLBCL GC ^H	13(40,6)
DLBCL non GC ^H	8(25%)
DLBCL NOS	1(3,1%)
HBGL	1(3,1%)
Transformed Indolent Lymphoma	7(21,9%)
PMBCL	2(6,25%)
CNS involment n(%)	4 (12.5%)
Pre-CAR-T cell status n(%)	
Stable disease	1 (3,13)
Progression	23 (71,9%)
Partial response	5 (15,6%)
Complete response	3 (9,38%)
LDH > ULN n(%)	23 (71,9%)
Median LDH UI/L [IQR]	245 [216,8-369,8]
Number of lines received	
Mean (Range)	3 (1-7)
> 2 lines of therapy n(%)	17 (53,1%)
Positive CMV serology n(%)	15 (46.9%)

Table 1 : Cohort III baseline characteristics

Abbreviations : CMV, Cytomegalovirus; CNS, Central Nervous System; DLBCL, Diffuse Large B Cell Lymphoma; GC, Germinative Center ; HBGL, High Grade B Cell Lymphoma ; LDH, Lactate Dehydrogenase; PMBCL: Primary Mediastinal B Cell Lymphoma; SD, Standard Deviation; U/L, Units by liter; ULN: Upper Limit of Normal.

^H : according to HANS Algorithm

In the leukapheresis product, the T cell median represented 85,1% [IQR 73,3-92,4%] of all T cells, with 40,8% [IQR 33,3-52,3%] median CD4 and 37,5 % [IQR 25,3-45,8%] median CD8 (Table 2).

In the CD4 population, T cell medians were 14,3% [IQR 6,6-28%] for TN, 43,6% [IQR 27,54,4%] for TCM, 26,4% [IQR 15,8-57%] for TEM, and 2,5% [IQR 1,3-5,1%] for TTD of CD4 T cells.

In the CD8 population, T cell medians were 12,8% [IQR 7-24,3%] for TN, 7% [IQR 3,5-13,1%] for TCM, 21,3% [IQR 15,4-37,7%] for TEM, and 43,8% [IQR 34,2-63,6%] for TTD of CD8 T cells.

A

Population	Leukapheresis median [IQR]
CD3 T cells ¹	85.1 [73.3 ; 92.4]
CD4 T cells ²	40.8 [33.3 ; 52.3]
Subsets	
CCR7 ³	68.0 [40.4 ; 78.9]
TN ³	14.3 [6.6 ; 28.0]
TCM ³	43.6 [27.0 ; 54.4]
TEM ³	26.4 [15.8 ; 50.7]
TTD ³	2.5 [1.3 ; 5.1]
CD8 T cell ²	37.5 [25.3 ; 45.8]
Subsets	
CCR7 ⁴	23.5 [12.2 ; 31.7]
TN ⁴	12.8 [7.0 ; 24.3]
TCM ⁴	7.0 [3.5 ; 13.1]
TEM ⁴	21.3 [15.4 ; 37.7]
TTD ⁴	43.8 [34.2 ; 63.6]

B

Population	CAR-T cell product median [IQR]	Day 7 CAR-T cell level median [IQR]	CAR-T cell Peak median [IQR]
CAR-T cells ²	69 [57 ; 71.5]		37.5 [16.1 ; 55.8]
CAR-T cells ⁵		44.5 [14 ; 116.5]	78.5 [40.5 ; 206.5]
CD4 CAR-T cells ⁵		14.0 [7.0 ; 46]	34.5 [13.5 ; 74.5]
CD8 CAR-T cells ⁵		16.0 [2.5 ; 54]	42.0 [11.0 ; 88.5]

Table 2 : T cell and CAR-T cell repartition in Cohort III (A) Leukapheresis repartition in Axi-cel Cohort show different subset repartition for CD4 and CD8 T cells, with a high level of TCM for CD4 and a high level of TTD for CD8 T cells. (B) CAR-T cell final product and expansion data (peak and CAR-T cell level at day 7) show a slightly higher amount of CD8 CAR-T cells against CD4 CAR-T cells at expansion.

Abbreviations : CCR7, CCR7 T cell; TCM, Central Memory T cell; TEM, Effector Memory T cell; TN, Naive T cell; TTD, Terminally Differentiated T cell.

- 1: As a percentage of total lymphocytes.
- 2: As a percentage of total T cells.
- 3: As a percentage of CD4 T cells.
- 4: As a percentage of CD8 T cells.
- 5: As a concentration in cells/mm³.

In the CAR-T cell product, the median Transduction rate was measured at 69% [IQR 57-71,5%] of all T cells. Median CAR-T cell peak was 78,5 cell/mm³ [IQR 40,5-206,5 cell/mm³] obtained at day 8 in median [IQR 0-4 days]. The median CAR-T cell concentration at day 7 was 44,5 cells/mm³ [IQR 14,116,5 cells/mm³].

CRS occurred from day 0 to day 7, with the median time of onset at day 1 [IQR 0-4 days]. Maximum CRS grade was reached at day 3 in median [IQR 1-5 days].

Data for CRS, neurotoxicity, cytopenias, death, and response rate are shown in Table 3.

Median maximal CRP was 118,5 mg/L [IQR 54-194,4 mg/L], median maximal fibrinogen was 5,4 mg/L [IQR 4,5-6,9 mg/L], and median maximal ferritin was 1017 ng/mL [IQR 516-2374,5 ng/mL].

Variable	n (%)
Cytokine Releasing Syndrome	
Grade 0	1 (3 %)
Grade ≥ 1	31 (97%)
Grade 1	21(65,6%)
Grade 2	9 (28,1%)
Grade 3	1 (3,13 %)
Neurotoxicity	
Grade 0	22 (69%)
Grade ≥ 1	10 (31%)
Grade 1	5 (31%)
Grade 2	3 (9%)
Grade 3	2 (6%)
Neutropenia any grade	32 (100%)
Grade ≥ 3	32 (100%)
Anemia any grade	29 (90,6%)
Grade ≥ 3	10 (31,25%)
Thrombopenia Any grade	21 (65,6%)
Grade ≥ 3	9 (28,1%)
Death	8 (25%)
Progression	3 (9,4%)
Infection	3 (9,4%)
Secondary neoplasia	1 AML (3,1%)
Other	1 unknow cause (3,1%)
Response at 1 month	
Global response	26 (81,3%)
Complete response	15 (46,9%)
Partial response	11 (34,4%)
Stable disease	2 (6,3%)
Progression	3 (9,4%)
Death	1 (3,1%)
Response at 3 months	
Global response	23 (71,8%)
Complete response	19 (59,4%)
Partial response	4 (9,4%)
Stable disease	1 (3,12)
Progression	5 (15,6%)
Death	3 (11,5%)
Response at 6 months	
Global response	20 (62,5%)
Complete response	18 (56,3%)
Partial response	2 (6,3%)
Progression	7 (21,9%)
Death	5 (15,6%)
Response at 12 months	
Global response	15 (46,9%)
Complete response	14 (43,8%)
Partial response	1 (3,1%)
Progression	8 (25%)
Death	6 (18,8%)
Missing Data ¹	3 (11,5%)

Table 3 : Tolerance and response assesment in Cohort III

¹: 3 patients were not evaluated at this time of the follow-up

Cytokine Releasing Syndrome	Grade ≤ 1 n=23(71.9%)	Grade >1 n=9 (28.1%)	P value²
CD4 TN from leukapheresis ¹	10.1 [5.6 ;23.7]	27.1 [23.1 ;39.0]	0.011
CD8 TN from leukapheresis ¹	16.0 [5.2 ;30.4]	12.3 [9.2 ;12.5]	0.54
CCR7 CD4 from leukapheresis ¹	64.7 [36.9 ;76.8]	79.2 [51.6 ;82.3]	0.090
CCR7 CD8 from leukapheresis ¹	25.2 [11.0 ;39.8]	19.7 [12.4 ;24.6]	0.49
Neurotoxicity	Grade 0 n=22 (68.8%)	Grade ≥ 1 n=10 (31.3%)	P value²
CD4 TN from leukapheresis ¹	12.6 [6.6 ;25.6]	19.7 [6.5 ;39.0]	0.44
CD8 TN from leukapheresis ¹	14.8 [6.4 ;29.8]	9.4 [7.5 ;16.9]	0.23
CCR7 CD4 from leukapheresis ¹	66.3 [43.5 ;77.5]	73.7 [35.4 ;82.3]	0.60
CCR7 CD8 from leukapheresis ¹	23.8 [13.8 ;39.8]	23.5 [11.9 ;28.0]	0.56
Neutropenia	Grade <3 n=0 (0%)	Grade ≥ 3 n=32 (100%)	P value
Anemia	Grade <3 n=22 (68.8%)	Grade ≥ 3 n=10 (31.3%)	P value²
CD4 TN from leukapheresis ¹	12.6 [6.6 ;27.1]	23.1 [6.5 ;28.8]	0.7
CD8 TN from leukapheresis ¹	16.5 [9.3 ;29.8]	9.5 [2.4 ;12.5]	0.064
CCR7 CD4 from leukapheresis ¹	68.0 [43.5 ;77.5]	64.4 [33.4 ;80.1]	1
CCR7 CD8 from leukapheresis ¹	25.6 [21.0 ;39.8]	14.6 [7.1 ;23.0]	0.03
Thrombopenia	Grade <3 n=23 (71.9%)	Grade ≥ 3 n= 9 (28.1%)	P value²
CD4 TN from leukapheresis ¹	12.8 [6.5 ;28.8]	23.1 [11.3 ;25.4]	0.79
CD8 TN from leukapheresis ¹	16.0 [9.2 ;25.2]	9.8 [5.1 ;12.5]	0.95
CCR7 CD4 from leukapheresis ¹	68.1 [37.2 ;78.6]	51.6 [49.2 ;80.1]	0.28
CCR7 CD8 from leukapheresis ¹	25.2 [13.8 ;33.3]	16.7 [7.3 ;23.8]	0.3
Response at 1 month	Other than CR n=17 (53,1%)	CR rate n=15 (46,9%)	P value²
CD4 TN from leukapheresis ¹	24.6 [9.0 ;34.2]	10.5 [5.6 ;23.1]	0.11
CD8 TN from leukapheresis ¹	12.9 [7.0 ;30.7]	12.8 [7.2 ;19.1]	0.56
CCR7 CD4 from leukapheresis ¹	75.7 [34.4 ;81.0]	66.3 [46.7 ;77.0]	0.73
CCR7 CD8 from leukapheresis ¹	25.9 [9.9 ;44.4]	23.1 [12.9 ;25.6]	0.51
Response at 3 months	Other than CR n=13 (40.6%)	CR rate n=19 (59.4%)	P value²
CD4 TN from leukapheresis ¹	23.1 [11.3 ;28.8]	10.8 [5.6 ;27.1]	0,47
CD8 TN from leukapheresis ¹	12.5 [7.5 ;31]	13.0 [5.2 ;21.4]	0,63
CCR7 CD4 from leukapheresis ¹	75.1 [49.2 ;78.6]	67.8 [40,4 ;78.4]	0,11
CCR7 CD8 from leukapheresis ¹	21 [2.4 ;39.8]	24,6 [12.9 ;28.3]	0,39

Table 4 : Clinical outcomes and leukapheresis immature subset in Axi-cel Cohort

Abbreviations: CCR7, CCR7 T cell ; CR, Complete Response rate; TN, Naive T cell.

1: As a percentage of the total T cell population, median [Interquartile Range].

2: P values are two-sided with a 5% significance level.

CRS and anemia are associated with leukapheresis T cell subsets but not response

CRS of grade > 1 ($p = 0,011$) was significantly associated with CD4 TN cells in the leukapheresis product, but there was no association with CD4 CCR7 T cells ($p=0,09$), CD8 TN ($p = 0,59$) or CD8 CCR7 T cells ($p = 0,49$) (Table 4).

No significant association was found between Neurotoxicity of grade >0 and CD4 TN ($p=0,44$), CD4 CCR7 T cells ($p=0,60$), CD8 TN ($p = 0,23$) or CD8 CCR7 T cells ($p=0,56$).

All patients presented grade ≥ 3 neutropenia.

Anemia of grade ≥ 3 was significantly associated with CD8 CCR7 T cells in the leukapheresis ($p = 0,03$), with a trend for CD8 TN ($p = 0,064$). There was no significant association with CD4 CCR7 T cells ($p= 1$) or CD4 TN ($p = 0,7$) and anemia of grade ≥ 3 .

No significant association was found between thrombopenia of grade ≥ 3 and CD4 TN ($p = 0,79$), CD4 CCR7 T cells ($p=0,28$), CD8 TN ($p= 0,95$) or CCR7 CD8 T cells ($p = 0,3$) in the leukapheresis product.

CR at 1 month was not associated with CD4 TN ($p=0,11$), CD8 TN ($p=0,56$), CD4 CCR7 T cell ($p=0,73$) or CD8 CCR7 T cell in the leukapheresis product ($p=0,51$). There was no association between CR at 3 months and CD4 TN ($p=0,47$), CD8 TN ($p=0,63$), CD4 CCR7 T cell ($p=0,11$) or CD8 CCR7 ($p=0,39$) T cell in leukapheresis product.

Leukapheresis subsets are associated with CAR-T cell level at day 7, but not CAR-T cell peak or

Transduction rate

Using the Spearman Correlation Test, we found a significant correlation between day 7 CAR-T cell level and CD4 TN in the leukapheresis product ($r = 0.47$, $p = 0.007$) and with CCR7 CD4 T cells ($r = 0.51$, $p = 0.003$). We didn't find any correlation between day 7 CAR-T cell level and CD8 TN ($r = 0.27$, $p = 0.13$), or CCR7 CD8 T cells ($r = 0.28$, $p = 0.12$).

There is a trend for a correlation between CD4 TN cells and CAR-T peak level ($r = 0.3$, $p= 0.09$) but no significant correlation. There is no association between the CAR-T cell peak and CD4 CCR7 T cells ($r = 0.25$, $p= 0.161$), CD8 TN ($r = 0.01$, $p = 0.94$), or CD8 CCR7 T cells ($r = 0.05$, p

= 0.789) in the leukapheresis product.

There was no significant statistical correlation between Transduction rate and TN CD4 ($r = 0.026$, $p = 0.89$), TN CD8 ($r = -0.065$, $p = 0.72$), CCR7 CD4 ($r = 0.014$, $p = 0,94$), or CCR7 CD8 ($r = -0.123$, $p = 0.502$) in leukapheresis product (Table 5).

Transduction rate	Correlation Coefficient Rho¹	P value²
CD4 TN from leukapheresis	0.026	0.89
CD8 TN from leukapheresis	-0.06511	0.72
CCR7 CD4 from leukapheresis	0.01449	0.94
CCR7 CD8 from leukapheresis	-0.12325	0.50
Day 7 CAR-T cell level	Correlation Coefficient Rho¹	P value²
CD4 TN from leukapheresis	0.46933	<0.01
CD8 TN from leukapheresis	0.27059	0.134
CCR7 CD4 from leukapheresis	0.51398	<0.01
CCR7 CD8 from leukapheresis	0.28131	0.119
CAR-T cell peak	Correlation Coefficient Rho¹	P value²
CD4 TN from leukapheresis	0.30467	0.09
CD8 TN from leukapheresis	0.01393	0.940
CCR7 CD4 from leukapheresis	0.25403	0.161
CCR7 CD8 from leukapheresis	0.04912	0.789

Table 5 : Transduction rate and Expansion outcomes

Abbreviations: CCR7, CCR7 T cells ; TN, Naive T cell.

1: Correlation Coefficient Rho is calculated by the Spearman correlation test.

2: P values are two-sided with a 5% significance level.

Transduction and expansion related outcomes

We used the Mann-Whitney U test to compare the Transduction rate with clinical outcomes.

We didn't find any significant statistical association between Transduction rate and grade > I CRS ($p = 0,699$), grade > 0 Neurotoxicity ($p = 0,99$), Grade ≥ 3 anemia ($p = 0,712$), grade ≥ 3 thrombopenia ($p = 0,444$), or with CR rate at 1 month ($p = 0,209$), nor 3 months ($p = 0,28$) (Table 6).

CAR-T cell level at day 7 was significantly associated with Grade > 1 CRS ($p = 0,006$) but there was no association with ICANS of any grade ($p = 0,13$), grade ≥ 3 anemia ($p = 0,32$) or grade ≥ 3 thrombopenia ($p = 0,4$). Seventy-five percent of patients with grade >1 CRS had a level of CAR-T cells at day 7 over 59 cells/mm³ and we also highlighted that 75% of patients with grade <2 CRS had less than 59 cells/mm³ CAR-T cells at day 7. We thus chose this threshold of 59 cells/mm³ for further exploration.

As expected, a CAR-T cell level above 59 cells/mm³ at day 7 was significantly associated with CRS grade >1 ($p = 0,015$), but was not significantly associated with ICANS ($p = 0,7$), anemia of grade ≥ 3 ($p = 0,47$), thrombopenia of grade ≥ 3 ($p = 0,11$), CR at 1 month ($p = 0,11$) or CR at 3 months ($p = 0,42$). CAR-T cell peak was not associated with grade > 1 CRS ($p = 0,051$), Grade > 0 ICANS ($p = 0,22$), grade ≥ 3 Anemia ($p = 0,65$), grade ≥ 3 Thrombopenia ($p = 0,54$), CR at 1 month ($p = 0,17$) or CR at 3 months ($p = 0,66$).

There was no statistical correlation using the Spearman Correlation Test between CAR-T cell level at day 7 with CRP ($r = 0.005$, $p = 0.979$), ferritin ($r = 0.16$, $p = 0,36$), and fibrinogen level ($r = -0.18$, $p = 0,31$). CAR-T cell peak is not associated with CRP maximal level ($r = 0.21$, $p = 0,259$), ferritin maximal level ($r = 0.22$, $p = 0,211$), or fibrinogen maximal level ($r = -0.10$, $p = 0,581$).

Cytokine Releasing Syndrome	Grade ≤ 1 n=23(71.9%)	Grade >1 n=9 (28.1%)	P value³
Transduction rate ¹	67.6 [59.9 ;71.5]	69.4 [62.4 ;70.9]	0.69
CAR-T cell at day 7 ²	25 [4 ;59]	160 [59 ; 210]	0.006
CAR-T cell Peak ²	61 [25 ;164]	169 [98 ;211]	0.051
Neurotoxicity	Grade 0 n=22 (68.8%)	Grade ≥ 1 n=10 (31.3%)	P value³
Transduction rate ¹	69 [59.9 ;71.7]	65.9 [54.6 ;69.9]	0.99
CAR-T cell at day 7 ²	26.5 [4 ;98]	58 [42 ;169]	0.13
CAR-T cell Peak ²	78.5 [25 ;164]	118.5 [57 ;285]	0.22
Anemia	Grade <3 n=22 (68.8%)	Grade ≥ 3 n=10 (31.3%)	P value³
Transduction rate ¹	69 [56.69 ;70.9]	67.5 [58.9 ;72.6]	0.71
CAR-T cell at day 7 ²	57.5 [20 ;160]	35.5 [3 ;59]	0.32
CAR-T cell Peak ²	82.5 [30 ;203]	60 [51 ;211]	0,65
Thrombopenia	Grade <3 n=23 (71.9%)	Grade ≥ 3 n= 9 (28.1%)	P value³
Transduction rate ¹	69.1 [57.3 ;71.5]	69 [57.8 ;69.4]	0.44
CAR-T cell at day 7 ²	31 [12 ;84]	76 [16 ;169]	0.4
CAR-T cell Peak ²	68 [30 ;203]	98 [59 ;211]	0.54
Response at 1 month	Other than CR n=17 (53,1%)	CR rate n=15(46,9%)	P value³
Transduction rate ¹	66.5 [57.4 ;73.1]	69.2 [61.7 ;70.9]	0.21
CAR-T cell at day 7 ²	58 [26.5 ;152]	22.5 [3.5 ;78.5]	0.11
CAR-T cell Peak ²	109.5 [58 ;248]	63 [27.5 ;162]	0.17
Response at 3 months	Other than CR n=13 (40.6%)	CR rate n=19 (59.4%)	P value³
Transduction rate ¹	69.4 [69 ;73.7]	64.2 [54.2 ;70.4]	0,28
CAR-T cell at day 7 ²	59 [24 ;98]	42 [4 ;160]	0,4
CAR-T cell Peak ²	84 [61 ; 169]	59 [30 ;210]	0,66

Table 6 : Expansion and Transduction outcomes in the Axi-cel Cohort

Abbreviations: CR, Complete Response rate.

1: As a percentage of the total T cell population, median [Interquartile Range].

2: As a concentration of CAR-T cells in cells/mm³ median [Interquartile Range].

3: P values are two-sided with a 5% significance level.

Gender and T cell aging factors do not correlate with leukapheresis T cell subsets

The Spearman correlation test did not find any association between age at leukapheresis and any immature T cell subset in leukapheresis. CD4 TN ($r = 0.22$, $p=0.21$), CD8 TN ($r = -0.016$, $p=0.93$), CD4 CCR7 T cells ($r = 0.29$, $p=0.098$) or CD8 CCR7 T cells ($r = 0.04$, $p=0.8$).

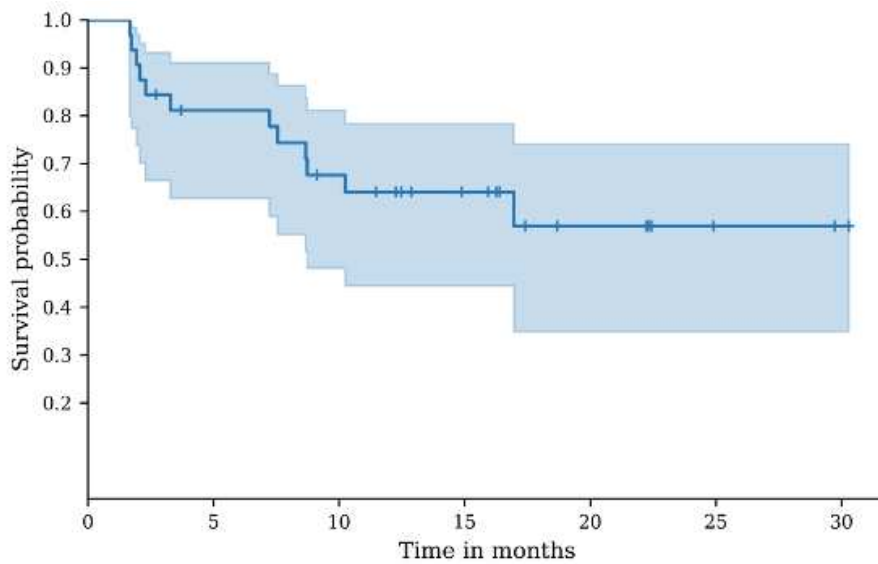
Patients who underwent more than two lines of treatment, positive CMV serology, and masculine or feminine gender were not significantly correlated with immature T cell subsets in leukapheresis.

(Supplemental Table IV, V).

Overall and Progression Free survival of Axi-cel Cohort

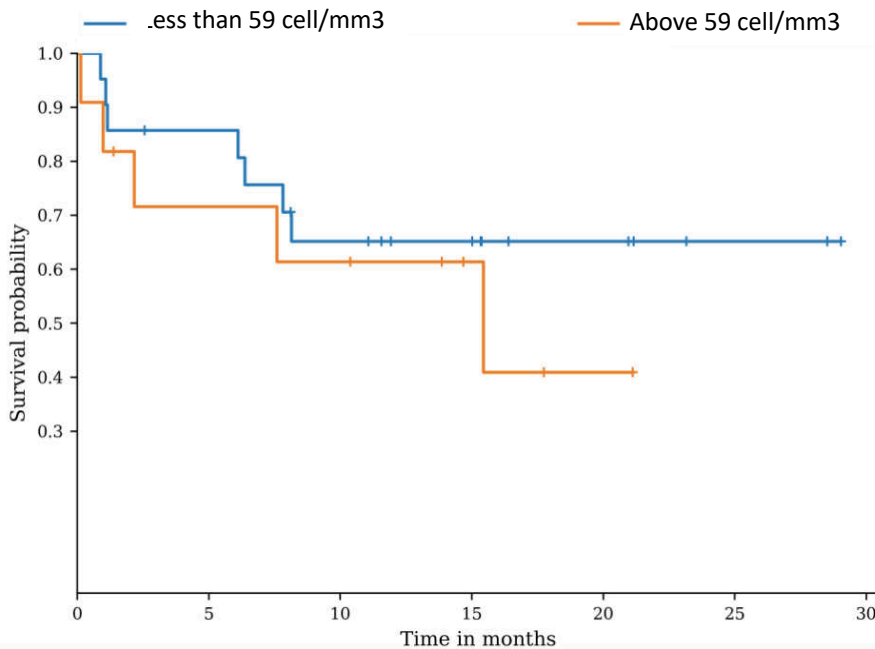
The median follow-up was 317,5 days [IQR 170-469 days]. Progression-Free Survival (PFS) at 6 months was 81.1% [95% CI, 62,7-91,1] and 64.0% [95% CI, 44,4-78,3%] at 12 months using The Kaplan-Meir method. The median PFS was estimated at 20,96 months, but it may be underestimated because the largest observation was censored, estimation was restricted to the largest event time. We did not find a difference in PFS between patients who had more than 59 CAR-T cells per mm³ and patients who had less than 59 CAR-T cells per mm³ using the Log rank test ($p = 0,2$) (Figure 4). Overall survival (OS) at 6 months was 87.5% [95% CI, 70-95,1] and 81.3% [95% CI, 62,9-91,1%] at 12 months (Supplemental Figure II).

A Progression-Free Survival



At risk	32	24	19	13	6	2	1
Censored	0	2	3	8	14	18	19
Events	0	6	10	11	12	12	12

B Progression-Free Survival



	No						
At risk	21	17	12	9	5	2	0
Censored	0	1	2	5	9	12	14
Events	0	3	7	7	7	7	7
	Yes						
At risk	11	7	6	3	1	0	0
Censored	0	1	1	4	5	6	6
Events	0	3	4	4	5	5	5

Figure 4 : Progression Free Survival curves in Cohort III. (A) Progression Free Survival is presented for Cohort III. (B) Progression Free Survival is not significantly different between patients who had more than 59 CAR-T cells per mm³ at day 7 and patients who had less than 59 CAR-T cells per mm³ at day 7 with the Log rank test (p = 0,2).

Discussion

Our study aimed to understand if T cell immunophenotyping in clinical practice could help find predictive markers of response or tolerance for patients infused with CAR-T cell therapy. Thus, we analyzed T cell subsets by immunophenotyping, whether it is carried out on leukapheresis samples, on CAR-T cell final product, or in vivo after reinjection.

We were able to follow T cell subset evolution throughout the manufacturing of CAR-T cells, until reinjection and sought to assess whether the over-representation of any subsets could impact patient outcomes.

Transduction rate study

In cohort I, even if there is a trend towards a higher transduction rate if CAR-T cells are produced from leukapheresis rich in CD4 TN, we do not find a significant statistical association between the naive, central memory or CCR7 subset of the leukapheresis product and Transduction rate. We assumed that the absence of statistical significance might be attributed to a limited sample size and the presence of cohort heterogeneity. However, in Cohort III, our homogeneous cohort reinjected by Axi-cel, transduction rate is not correlated with immature subpopulations or with any clinical outcome of interest (CR, CRS grade >1, Neurotoxicity linked to CAR-T cells, anemia/thrombocytopenia grade >2). The correlation between transduction rate and efficacy has been relatively underexplored; however, Štach et al. reported comparable findings. (30)

It is therefore possible that the transduction rate is not correlated with leukapheresis immaturity due to the complexity of CAR-T cell manufacturing mechanisms that could modify T cell subset distribution.

T cell subset evolution from leukapheresis to CAR-T cell product

By comparing leukapheresis and CAR-T cell products, we observed a proportional increase in TCM and TEM populations at the expense of TN and TTD populations. This orientation towards a memory phenotype is probably linked to T cell activation during CAR-T cell manufacturing.

Indeed, during CAR-T cell manufacturing, T cell are activated by several methods, notably with

IL-2 that enhance T cell survival and expansion but also promote T cell phenotype towards memory phenotype. (31–33) The CAR-T cell phenotype therefore becomes mainly composed of cells with high replicative potential, such as TCM and TEM. Conversely, TTD having lost their proliferation capacities will be underrepresented. (34)

Our results are in line with Monfrini et al. who analyzed 38 CAR-T cell products (16 Tisa-cel and 22 Axi-cel) and showed a difference in terms of the distribution of CAR-T cell subpopulations. This difference is, however, erased in the face of similar in vivo expansion T cell subset repartition and kinetics between the Axi-cel and Tisa-cel. (35) As immunophenotyping of T cell and CAR-T cell subsets in leukapheresis and the final product is not carried out routinely, all these data must be validated on larger cohorts in real life settings.

Immunophenotype analysis did not reveal any predictive factors for response

Due to the constraints linked to CAR-T cell manufacturing (complexity of the circuit, manufacturing times, high cost), the risk of relapse after reinjection, and the adverse effects induced by CAR-T cells, predictive markers could help clinicians validate CAR-T cell treatment.

In our study, we did not find a significant association between leukapheresis T cell subsets and CR rate at 1 and 3 months, which is in line with Xu et al. work. (36) Remarkably, Sauter et al. also observed an elevated relapse rate when the leukapheresis product was abundant in CD8 TN. (37) Several studies show the exact opposite with CD8 TN (27,30,38,39) and TCM CD8 (38) correlated with response rate. Identifying a predictive factor of response for CAR-T cell therapy is challenging, and additional studies are needed to deepen our understanding of CAR-T cell therapy.

Leukapheresis T cell subset is a predictive marker of CRS and anemia

In our study, a high level of CD4 TN in leukapheresis is correlated with an increasing risk of grade > 1 Cytokine Release Syndrome. CRS risk is tied to a heightened in vivo expansion, as there is a correlation between TN CD4 level and CAR-T cell level at day 7, which in turn is associated

with the risk of grade >1 CRS. In our study, CD8 CCR7 level in the leukapheresis product is significantly correlated with the occurrence of grade ≥ 3 anemia. A trend is observed for the level of CD8 TN without significant difference, possibly linked to a lack of patients. On the other hand, we did not find an association between the CD8 CCR7 and the risk of Grade ≥ 3 thrombocytopenia, despite the similar incidence with grade > 3 anemia. This result is hard to explain because there is not much pathophysiological explanation for it, and several co-factors of early cytopenias after CAR-T cell reinjection are identified (bone marrow infiltration, lymphodepletion, or bridging toxicity, but also overwhelming inflammation during Cytokine Release Syndrome). (41,42)

Expansion evaluation for in vivo CAR-T cells

We highlighted that CAR-T level on day 7 is correlated with the risk of CRS grade >1, whereas CAR-T cell peak is not possibly due to a lack of patients to enhance statistical power. In our study, CAR-T cell level at day 7 is a better surrogate marker than CAR-T cell peak, which is the main expansion marker used. Unfortunately, CAR-T cell level at day 7 cannot be used as a CRS predictive marker because CRS occurs earlier than day 7, but it could be used as a confirmation marker for CRS against the main differential diagnosis, which is infection in neutropenic patients. As seen in literature, CD4 CAR-T cells during expansion are highly correlated with CRS. (43,44)

The literature data is discordant on the link between the expansion and response. Our work shows no correlation between expansion and response. These results are in line with Schuster et al. in JULIET trial (45) but several studies like ZUMA-1 and ZUMA-2 trials do find a correlation between expansion of CAR-T cells in vivo and an improvement in the survival rate. (35,40,46,47) The work of Good et al. can help to understand this disparity of results. They analyzed CAR-T cell subsets in vivo and found that the response is linked to a low regulatory T cell proportion at the peak. (48) Another hypothesis is that our results were biased by a double correlation. Most of our population showed progressive disease, which is linked to a high tumor

burden. High tumor burden is a known factor in the lack of response after CAR-T cell infusion (30,49,50) but it is also associated with CAR-T cell expansion. (47,51)

Study Limitations

Our results were obtained on a population of patients treated with Axi-cel and are therefore not generalizable to other CAR-T cells. The retrospective nature and small number limit the interpretation of the data. However, our cohort represents one of the most important in real-life settings for the analysis of subpopulations of leukapheresis.

Conclusion

Leukapheresis richness in CD4 TN is a predictive marker of the risk of CRS grade > 1 and the risk of grade ≥ 3 anemia linked to the richness of the leukapheresis product in CD8 CCR7 T cells, without link evident with response to treatment.

References

1. Locke FL, Miklos DB, Jacobson CA, Perales MA, Kersten MJ, Oluwole OO, et al. Axicabtagene Ciloleucel as Second-Line Therapy for Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 17 févr 2022;386(7):640-54.
2. Jacobson CA, Chavez JC, Sehgal AR, William BM, Munoz J, Salles G, et al. Axicabtagene ciloleucel in relapsed or refractory indolent non-Hodgkin lymphoma (ZUMA-5): a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. janv 2022;23(1):91-103.
3. Shah BD, Ghobadi A, Oluwole OO, Logan AC, Boissel N, Cassaday RD, et al. KTE-X19 for relapsed or refractory adult B-cell acute lymphoblastic leukaemia: phase 2 results of the single-arm, open-label, multicentre ZUMA-3 study. *Lancet Lond Engl*. 7 août 2021;398(10299):491-502.
4. Locke FL, Ghobadi A, Jacobson CA, Miklos DB, Lekakis LJ, Oluwole OO, et al. Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1–2 trial. *Lancet Oncol*. janv 2019;20(1):31-42.
5. Munshi NC, Anderson LD, Shah N, Madduri D, Berdeja J, Lonial S, et al. Idecabtagene Vicleucel in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 25 févr 2021;384(8):705-16.
6. Berdeja JG, Madduri D, Usmani SZ, Jakubowiak A, Agha M, Cohen AD, et al. Ciltacabtagene autoleucel, a B-cell maturation antigen-directed chimeric antigen receptor T-cell therapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (CARTITUDE-1): a phase 1b/2 open-label study. *Lancet Lond Engl*. 24 juill 2021;398(10297):314-24.
7. Abramson JS, Palomba ML, Gordon LI, Lunning MA, Wang M, Arnason J, et al. Lisocabtagene maraleucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): a multicentre seamless design study. *The Lancet*. 19 sept 2020;396(10254):839-52.
8. Kamdar M. Lisocabtagene Maraleucel (liso-cel), a CD19-Directed Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cell Therapy, Versus Standard of Care (SOC) with Salvage Chemotherapy (CT) Followed By Autologous Stem Cell Transplantation (ASCT) As Second-Line (2L) Treatment in Patients (Pts) with Relapsed or Refractory (R/R) Large B-Cell Lymphoma (LBCL): Results from the Randomized Phase 3 Transform Study. In ASH; 2021 [cité 2 avr 2022]. Disponible sur: <https://ash.confex.com/ash/2021/webprogram/Paper147913.html>
9. Westin JR, Kersten MJ, Salles G, Abramson JS, Schuster SJ, Locke FL, et al. Efficacy and safety of CD19-directed CAR-T cell therapies in patients with relapsed/refractory aggressive B-cell lymphomas: Observations from the JULIET, ZUMA-1, and TRANSCEND trials. *Am J Hematol*. 1 oct 2021;96(10):1295-312.
10. Fowler NH, Dickinson M, Dreyling M, Martinez-Lopez J, Kolstad A, Butler J, et al. Tisagenlecleucel in adult relapsed or refractory follicular lymphoma: the phase 2 ELARA trial. *Nat Med*. févr 2022;28(2):325-32.
11. Lichtenstein DA, Schischlik F, Shao L, Steinberg SM, Yates B, Wang HW, et al. Characterization of HLH-like manifestations as a CRS variant in patients receiving CD22 CAR T cells. *Blood*. 16 déc 2021;138(24):2469-84.
12. Sheth V, Gauthier J. Taming the Beast: CRS and ICANS after CAR T-cell therapy for ALL. *Bone Marrow Transplant*. mars 2021;56(3):552-66.
13. Belin C, Devic P, Ayrignac X, Dos Santos A, Paix A, Sirven-Villaros L, et al. Description of neurotoxicity in a series of patients treated with CAR T-cell therapy. *Sci Rep*. 4 nov 2020;10(1):18997.
14. Brudno JN, Kochenderfer JN. Recent advances in CAR T-cell toxicity: Mechanisms, manifestations and management. *Blood Rev*. mars 2019;34:45-55.
15. Yakoub-Agha I, Moreau AS, Ahmad I, Borel C, Hadhoum N, Masouridi-Levrat S, et al. Prise en charge pratique du syndrome de relargage des cytokines (CRS) post-CAR-T cells chez l'adulte et l'enfant : recommandation de la Société francophone de greffe de moelle et de

- thérapie cellulaire (SFGM-TC). *Bull Cancer (Paris)*. 1 janv 2019;106(1, Supplement):S102-9.
16. Fesnak A, Lin C, Siegel DL, Maus MV. CAR-T Cell Therapies From the Transfusion Medicine Perspective. *Transfus Med Rev*. juill 2016;30(3):139-45.
 17. Tomasik J, Jasiński M, Basak GW. Next generations of CAR-T cells - new therapeutic opportunities in hematology? *Front Immunol*. 28 oct 2022;13:1034707.
 18. Rubio MT, Galaine J, Borg C, Daguindau É. Biologie, concepts et principes des CAR-T cells. *Bull Cancer (Paris)*. 1 déc 2018;105:S135-46.
 19. Sterner RC, Sterner RM. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer J*. 6 avr 2021;11(4):69.
 20. Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med*. 18 sept 2011;17(10):1290-7.
 21. Golubovskaya V, Wu L. Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers*. 15 mars 2016;8(3):36.
 22. Gattinoni L, Klebanoff CA, Restifo NP. Paths to stemness: building the ultimate antitumour T cell. *Nat Rev Cancer*. oct 2012;12(10):671-84.
 23. Demaret J, Varlet P, Trauet J, Beauvais D, Grossemy A, Hégo F, et al. Monitoring CAR T-cells using flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. mars 2021;100(2):218-24.
 24. Berger C, Jensen MC, Lansdorp PM, Gough M, Elliott C, Riddell SR. Adoptive transfer of effector CD8+ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. *J Clin Invest*. 2 janv 2008;118(1):294-305.
 25. Hinrichs CS, Borman ZA, Gattinoni L, Yu Z, Burns WR, Huang J, et al. Human effector CD8+ T cells derived from naive rather than memory subsets possess superior traits for adoptive immunotherapy. *Blood*. 20 janv 2011;117(3):808-14.
 26. Turtle CJ, Hanafi LA, Berger C, Gooley TA, Cherian S, Hudecek M, et al. CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *J Clin Invest*. 1 juin 2016;126(6):2123-38.
 27. Cuffel A, Allain V, Faivre L, Di Blasi R, Morin F, Vercellino L, et al. Real-world characteristics of T-cell apheresis and clinical response to tisagenlecleucel in B-cell lymphoma. *Blood Adv*. 21 juin 2022;bloodadvances.2022007057.
 28. Yakoub-Agha I, Saule P, Depil S, Micol JB, Grutzmacher C, Boulanger-Villard F, et al. A high proportion of donor CD4⁺ T cells expressing the lymph node-homing chemokine receptor CCR7 increases incidence and severity of acute graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancy. :9.
 29. Varlet P, Alsuliman T, Trauet J, Demaret J, Labalette M, Yakoub-Agha I. Donor-derived CD4+/CCR7+ T-cell impact on acute GVHD incidence following haplo-HCT after reduced intensity conditioning and posttransplant cyclophosphamide. *Bone Marrow Transplant*. oct 2019;54(10):1686-93.
 30. Štach M, Pytlík R, Šmilauerová K, Rychlá J, Mucha M, Musil J, et al. Characterization of the input material quality for the production of tisagenlecleucel by multiparameter flow cytometry and its relation to the clinical outcome. *Pathol Oncol Res*. 20 avr 2023;29:1610914.
 31. Gong W, Hoffmann JM, Stock S, Wang L, Liu Y, Schubert ML, et al. Comparison of IL-2 vs IL-7/IL-15 for the generation of NY-ESO-1-specific T cells. *Cancer Immunol Immunother*. 1 juill 2019;68(7):1195-209.
 32. Kondo T, Imura Y, Chikuma S, Hibino S, Omata-Mise S, Ando M, et al. Generation and application of human induced-stem cell memory T cells for adoptive immunotherapy. *Cancer Sci*. 2018;109(7):2130-40.
 33. Markley JC, Sadelain M. IL-7 and IL-21 are superior to IL-2 and IL-15 in promoting human T cell-mediated rejection of systemic lymphoma in immunodeficient mice. *Blood*. 4 avr 2010;115(17):3508.
 34. Castella M, Caballero-Baños M, Ortiz-Maldonado V, González-Navarro EA, Suñé G, Antoñana-Vidósola A, et al. Point-Of-Care CAR T-Cell Production (ARI-0001) Using a Closed Semi-automatic Bioreactor: Experience From an Academic Phase I Clinical Trial. *Front Immunol*. 20 mars 2020;11:482.

35. Monfrini C, Stella F, Aragona V, Magni M, Ljevar S, Vella C, et al. Phenotypic Composition of Commercial Anti-CD19 CAR T Cells Affects In Vivo Expansion and Disease Response in Patients with Large B-cell Lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2 août 2022;28(15):3378-86.
36. Xu Y, Zhang M, Ramos CA, Durett A, Liu E, Dakhova O, et al. Closely related T-memory stem cells correlate with in vivo expansion of CAR-CD19-T cells and are preserved by IL-7 and IL-15. *Blood*. 12 juin 2014;123(24):3750-9.
37. Sauter CS, Senechal B, Rivière I, Ni A, Bernal Y, Wang X, et al. CD19 CAR T cells following autologous transplantation in poor-risk relapsed and refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 15 août 2019;134(7):626-35.
38. 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.
39. 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*. 21 mars 2019;129(6):2210-21.
40. Rossi J, Paczkowski P, Shen YW, Morse K, Flynn B, Kaiser A, et al. Preinfusion polyfunctional anti-CD19 chimeric antigen receptor T cells are associated with clinical outcomes in NHL. *Blood*. 23 août 2018;132(8):804-14.
41. Fried S, Avigdor A, Bielorai B, Meir A, Besser MJ, Schachter J, et al. Early and late hematologic toxicity following CD19 CAR-T cells. *Bone Marrow Transplant*. oct 2019;54(10):1643-50.
42. Cordeiro A, Bezerra ED, Hirayama AV, Hill JA, Wu QV, Voutsinas J, et al. Late Events after Treatment with CD19-Targeted Chimeric Antigen Receptor Modified T Cells. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. janv 2020;26(1):26-33.
43. Boulch M, Cazaux M, Cuffel A, Ruggiu M, Allain V, Corre B, et al. A major role for CD4+ T cells in driving cytokine release syndrome during CAR T cell therapy. *Cell Rep Med [Internet]*. 17 août 2023 [cité 22 août 2023];0(0). Disponible sur: [https://www.cell.com/cell-reports-medicine/abstract/S2666-3791\(23\)00314-2](https://www.cell.com/cell-reports-medicine/abstract/S2666-3791(23)00314-2)
44. Bove C, Arcangeli S, Falcone L, Camisa B, Khoury RE, Greco B, et al. CD4 CAR-T cells targeting CD19 play a key role in exacerbating cytokine release syndrome, while maintaining long-term responses. *J Immunother Cancer*. 1 janv 2023;11(1):e005878.
45. 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.
46. Wang M, Munoz J, Goy A, Locke FL, Jacobson CA, Hill BT, et al. KTE-X19 CAR T-Cell Therapy in Relapsed or Refractory Mantle-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2 avr 2020;382(14):1331-42.
47. Locke FL, Rossi JM, Neelapu SS, Jacobson CA, Miklos DB, Ghobadi A, et al. Tumor burden, inflammation, and product attributes determine outcomes of axicabtagene ciloleucel in large B-cell lymphoma. *Blood Adv*. 13 oct 2020;4(19):4898-911.
48. Good Z, Spiegel JY, Sahaf B, Malipatlolla MB, Ehlinger ZJ, Kurra S, et al. Post-infusion CAR TReg cells identify patients resistant to CD19-CAR therapy. *Nat Med*. sept 2022;28(9):1860-71.
49. Dean EA, Mhaskar RS, Lu H, Mousa MS, Krivenko GS, Lazaryan A, et al. High metabolic tumor volume is associated with decreased efficacy of axicabtagene ciloleucel in large B-cell lymphoma. *Blood Adv*. 23 juill 2020;4(14):3268-76.
50. Vercellino L, Di Blasi R, Kanoun S, Tessoulin B, Rossi C, D'Aveni-Piney M, et al. Predictive factors of early progression after CAR T-cell therapy in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Adv*. 12 nov 2020;4(22):5607-15.
51. Turtle CJ, Hanafi LA, Berger C, Hudecek M, Pender B, Robinson E, et al. Immunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma with a defined ratio of CD8⁺ and CD4⁺ CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells. *Sci Transl Med [Internet]*. 7 sept 2016


Tables

Table 1 : Cohort III baseline characteristics	50
Table 2 : T cell and CAR-T cell repartition in Cohort III.	51
Table 3 : Tolerance and response assesment in Cohort III	53
Table 4 : Clinical outcomes and leukapheresis immature subset in Axi-cel Cohort.....	54
Table 5 : Transduction rate and Expansion outcomes.....	56
Table 6 : Expansion and Transduction outcomes in the Axi-cel Cohort	58

Figures

Figure 1 : Flowchart	46
Figure 2 : Leukapheresis T cell repartition in Cohort I.	47
Figure 3 : Leukapheresis and CAR-T cells repartition in Cohort III.....	49
Figure 4 : Progression Free Survival curves in Cohort III.	60

Supplemental Materials

 Service des Maladies du sang	Consentement au prélèvement de lymphocytes, traitement par CART-cells et collection biologique (DOC/CART/05)	Code du document : [6-Document] / [Qualité] / [QUA-DOC-001431]
		Date d'application : [01/04/2021] Version : [005]
		Page 1 sur 2

CONSETEMENT ÉCLAIRÉ

POUR UNE LYMPHOPHÉRÈSE EN VUE D'UN TRAITEMENT PAR CART CELLS, LE TRAITEMENT PAR CART-CELLS ET LA COLLECTE BIOLOGIQUE

Je soussigné(e) (nom de naissance, nom d'usage, prénom, date de naissance)

.....

Accepte le prélèvement de lymphocytes, en toute liberté, dans les conditions précitées, dans l'objectif d'un traitement par CART cells.

Je reconnais avoir été informé(e), par le Pr./Dr (Nom, prénom)de l'hôpital/ l'EFS de (ville) des modalités de prélèvement et de ses conséquences. J'ai pu poser toutes les questions relatives à ce recueil. J'ai été préalablement informé(e) par le médecin des effets secondaires possibles, des risques encourus et des conséquences éventuelles de ce mode de collecte. J'accepte de recevoir le traitement associé au prélèvement.

Je déclare avoir reçu des informations claires et complètes sur le traitement proposé par CART-cells, que je peux retrouver dans la notice d'information qui m'a été remise. J'ai pu poser toutes les questions concernant les procédures impliquées. J'ai été préalablement informé(e) par le médecin des effets secondaires possibles, des risques encourus et des conséquences éventuelles.

Le Pr./Dr (Nom, prénom), médecin investigateur, m'a proposé de participer à la recherche intitulée «Identification des déterminants cellulaires et moléculaires de l'efficacité et de la résistance chez les patients sous thérapie CAR-T au CHU de Lille : Une étude exploratoire avec collecte et stockage prospectif de données biologiques: Etude CAR-LILLE», promue par le Centre Hospitalier Universitaire de Lille.

J'ai été informé(e) de l'objectif de cette recherche, de la façon dont elle va être réalisée et de ce que ma participation va impliquer pour moi.

J'ai reçu des informations orales sur la recherche et j'ai lu les informations écrites. J'ai pu discuter de cette recherche et poser des questions, auxquelles j'ai reçu des réponses satisfaisantes.

J'ai eu suffisamment de temps pour réfléchir à ma participation à cette recherche.

J'ai noté que des analyses biologiques seront effectuées sur mon sang et que celles-ci comportent notamment la recherche de maladies transmissibles dont le VIH. Je serai informé(e) en cas de résultat anormal.

Je sais que ce consentement est révoquant à tout moment, sans avoir à me justifier.

En cochant cette case, j'accepte que des prélèvements biologiques effectués dans le cadre du suivi de mon traitement soient conservés (biothèque, sérothèque, DNAtèque, RNAtèque...) dans un but réglementaire et scientifique, en rapport avec le traitement par CART cells programmé.	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
J'ai également pris connaissance de la possibilité de congélation de mes cellules dans un but thérapeutique ultérieur.		
En cochant cette case, j'accepte que les données concernant la totalité de mon traitement ainsi que le suivi soient transmises de façon confidentielle au centre greffeur et à des registres internationaux, dans les conditions prévues par la loi.	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
En cochant cette case, j'accepte qu'un prélèvement supplémentaire d'échantillon biologique soit prélevé au cours d'un prélèvement programmé pour ma prise en charge médicale.	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
En cochant cette case, j'accepte que ces prélèvements puissent faire l'objet d'une collection d'échantillons biologiques qui sera conservée.	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
En cochant cette case, j'accepte qu'en cas de non utilisation d'une partie des cellules prélevées, elles puissent être utilisées à des fins de recherches scientifiques ou détruites à des fins de démarche qualité et de recherche	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
En cochant cette case, j'accepte, en toute connaissance de cause et en toute liberté, de recevoir le traitement proposé dans les conditions précitées.	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>

Fait à le

Nom, Prénom du Médecin
ayant fourni l'information

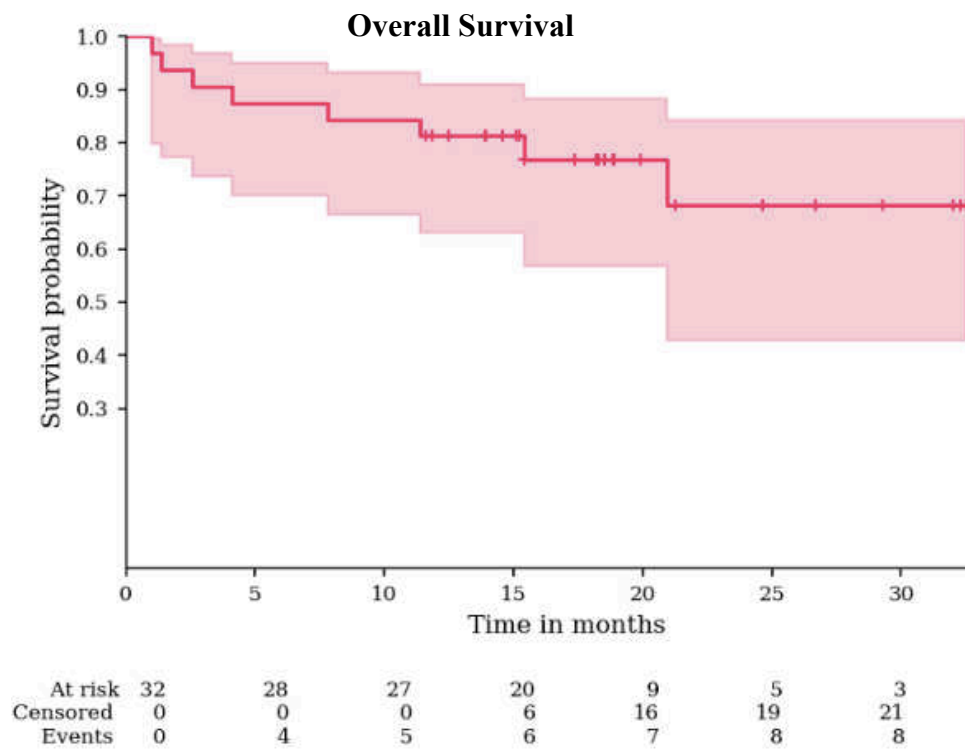
Nom, Prénom du donneur

Signature :

Signature :

Seule la version informatique du logiciel de gestion documentaire est valide
© Document interne, propriété du C.H.U de Lille

Supplemental Figure I: CAR-LILLE Study Consent



Supplemental Figure II: Overall Survival (OS) in Cohort III

Hemopathy / CAR-T cell type	Number of Patients (% all patients)
Multiple Myeloma	14 (17%)
Ide-cel	11 (13,6%)
Cilta-cel	3 (3,7%)
Non Hodgkin Lymphoma	67 (82,7%)
Diffuse Large B Cell Lymphoma	43 (53%)
Axi-cel	36 (44,4%)
Tisa-cel	7 (8,6%)
Transformed Follicular Lymphoma	11 (13,6%)
Axi-cel	11 (13,6%)
Follicular Lymphoma under grade 3b	5 (6,2%)
Tisa-cel	5 (6,2%)
Mantle Cell Lymphoma	8 (9,9%)
Brexu-cel	8 (9,9%)
Acute Lymphoblastic Leukemia	0

Supplemental Table IA: Supplemental Cohort I characteristics

Variables	Ide-cel n= 11 (%)	Cilta-cel n= 3 (%)
Median Age, years (range)	56 (38-72)	53 (49-67)
Male sex	5 (45,5%)	3 (100%)
Performance status		
0	2 (18,2%)	2 (66,7%)
1	8 (72,7%)	1 (33,3%)
≥ 2	2 (16,7%)	0
Median Line of treatment (range)	4 (3-11)	4 (3-5)
R-ISS		
Missing data	3 (27,3%)	1 (33,3%)
I	1 (9,1%)	0
II	2 (18,2%)	0
III	6 (54,5%)	2 (66,7%)
Cytogenetic group:		
Missing data	1 (9,1%)	0
Standard	5 (45,5%)	1 (33,3%)
High risk	6 (54,5%)	2 (66,7%)
Extra-medullary lesion		
Yes	5 (41,6%)	1 (33,3%)
No	7 (63,6%)	2 (66,7%)
Central Nervous System involvement	1 (9,1%)	0
Plasma cell Leukemia	2 (18,2%)	0
Monoclonal component		
IgG	5 (45,5%)	0
IgA	3 (27,3%)	1 (33,3%)
IgM	0	0
Kappa serum free light chain	1 (9,1%)	1 (33,3%)
Lambda serum free light chain	1 (9,1%)	1 (33,3%)
Non secreting Myeloma	1 (9,1%)	0
Bridging therapy	11 (100%)	3 (100%)
Autologous Stem Cell Transplant	10 (90,9%)	3 (100%)
Simple AT SCT	9 (81,8%)	3 (100%)
Double AT SCT	1 (9,1%)	0
Heterologous Stem Cell Transplant	0	0
Other CAR-T therapy	0	0
Pre-infusion status		
Penta-Refractory	11 (100%)	3 (100%)
Complete Response ^u	0	0
Very good Partial Response ^u	2 (18,2%)	0
Partial Response ^u	0	0
Stable Disease ^u	1 (9,1%)	1 (33,3%)
Progression ^u	9 (81,8%)	2 (66,7%)

Supplemental Table IB: Cohort I Myeloma patient characteristics

Abbreviations : R-ISS, Revised International Staging System.

^u according to the International Myeloma Work Group response criteria.

Variables	Axi-cel n= 47(%)	Tisa-cel n= 7 (%)
Median Age, years (range)	56,24 (19,12-77,25)	66,58 (60,22-74,95)
Male sex	34 (72,3%)	5 (71,4%)
Performance status		
0	26 (55,3%)	2 (28,6%)
1	20 (42,6%)	4 (57,1%)
≥ 2	1 (2,1%)	1 (14,3%)
Median Line of treatment (range)	3 (1-7)	2 (1-5)
Lactate Dehydrogenase > Upper Limit of Normal	29 (61,7%)	4 (57,1%)
Histological Sub-type		
Diffuse Large B cell Lymphoma GC ^H	15 (31,9%)	0
Diffuse Large B cell Lymphoma non-GC ^H	12 (25,6%)	0
Double hit Lymphoma	1 (2,1%)	1 (14,3%)
Primary Mediastinal B Cell Lymphoma	2 (4,3%)	0
Transformed Follicular Lymphoma	1 (2,1%)	0
IRF4 Large B cell Lymphoma	1 (2,1%)	0
T-cell/Histiocyte Rich B Cell Lymphoma	1 (2,1%)	0
Diffuse Large B cell Lymphoma NOS	1 (2,1%)	0
Transformed Poppema Lymphoma	0	0
Transformed Low Grade Lymphoma	1 (2,1%)	0
Diffuse Large B cell Lymphoma NOS	1 (2,1%)	0
Grey zone Lymphoma	0	1 (14,3%)
Richter Transformation	0	4 (57,1%)
Transformed Grey Zone Transformed	0	1 (14,3%)
Waldenström Macroglobulinemia	1 (2,1%)	0
Extra-medullary lesion	Missing data	Missing data
Extra-nodal lesion	Missing data	Missing data
Central Nervous System involvement	6 (12,8%)	1 (14,3%)
Bridging therapy		
Yes	39(83%)	6 (85,7%)
No Bridge	8 (17%)	1 (14,3%)
PIVER	2 (4,3%)	0
REVLIMID	4 (8,5%)	0
IBRUTINIB	1 (2,1%)	0
REVLIMID-IBRUTINIB	4 (8,5%)	0
Corticotherapy	1 (2,1%)	2 (28,6%)
ICE	2 (4,3%)	0
High dose Cytarabine containing regimen	5 (10,6%)	0
Methotrexate containing regimen	2 (4,3%)	0
Holoxan-Etoposide +- Rituximab	1 (2,1%)	1 (14,3%)
Radiotherapy	1 (2,1%)	0
PEMBROLIZUMAB	1 (2,1%)	0
R-mini-CHOP-VENETOCLAX	1 (2,1%)	0
ESHAP	1 (2,1%)	1 (14,3%)
Celmod Protocol	1 (2,1%)	0
R-MIV	1 (2,1%)	0
GEMCITABINE containing regimen	1 (2,1%)	2 (28,6%)
Autologous Stem Cell Transplantation	0	0
Heterologous Stem Cell Transplantation	1 (2,1%)	0
Primary Refractory	Missing data	Missing data
Early Relapse (< 1 year)	Missing data	Missing data
Pre-infusion status		
Complete Response ^λ	3 (6,4%)	3 (42,9%)
Partial Response ^λ	9 (19,1%)	0
Stable Disease ^λ	8 (17%)	1 (14,3%)
Progression ^λ	27 (57,4%)	3 (42,9%)

Supplemental Table IC: Cohort I Non-Hodgkin Lymphoma without Mantle Cell Lymphoma patient characteristics

Abbreviations : CHOP, Cyclophosphamide-Doxorubicine-Vincristine-Prednisone; ESHAP, Etoposide-SOLUMEDROL-High Dose Aracytine- Cisplatin; ICE, Ifosfamide-Carboplatine-Etoposide ; PIVER, Pixantrone-Ifosfamide-Etoposide-Rituximab; R-MIV, Rituximab-Methotrexate-Ifosfamide-Vincristine.

^λ according to the LUGANO Response Criteria.

^H according to the Hang Algorhythm.

Variables	Brexu-cel n= 8 (%)
Median Age, years (range)	69 (62-75)
Male sex	6 (75%)
Extra-nodal lesion	6 (75%)
Splenic lesion	2 (25%)
Medullary lesion	3 (37,5%)
Central Nervous System involvement	1 (12,5%)
Performance status	
0	3 (37,5%)
1	5 (62,5%)
Histological Sub-type	
Blastoid	6 (75%)
Pleomorphic	1 (12,5%)
Classical	2 (25%)
S-MIPI	Missing data
Ki-67 > 30%	5 (62,5%)
Missing data	3 (37,5%)
Cyclin D1 Overexpression	
Yes	3 (37,5%)
Missing data	4 (50%)
t(11;14)	
No	2 (25%)
Missing data	6 (75%)
Autologous Stem Cell Transplantation	1 (12,5%)
Heterologous Stem Cell Transplantation	0
TP53	
Missing data	6 (75%)
Positive	2 (25%)
Bruton Tyrosine-Kinase Inhibitor exposed	8 (100%)

Supplemental Table ID: Cohort I Mantle Cell Lymphoma patient characteristics

Variables	Brexu-cel n= 5 (%)
Median Age, years (range)	69 (65-72)
Male sex	3 (60%)
Lymphoma lesion number ≥ 2	4 (80%)
Performance status	
0	3 (60%)
1	2 (40%)
FLIPI score	
Missing data	1 (20%)
Low risk	0
Intermediate risk	2 (40%)
High risk	2 (40%)
Refractory to Previous Treatment	5 (100%)
Double Refractory ¹	5 (100%)
Autologous Stem Cell Transplantation	0
Heterologous Stem Cell Transplantation	0
POD24	4 (80%)

Supplemental Table IE: Cohort I Follicular Under Grade 3B Cell Lymphoma patient characteristics

Abbreviations : POD24, Progression of Decease within 24 months of the last treatment.

¹: (Alkylating Agent + Rituximab).

Hemopathy / CAR-T cell type	Number of Patients (% all patients)
Non Hodgkin Lymphoma	16 (100%)
Diffuse large B cell Lymphoma	10 (62,5%)
Axi-cel	8 (50%)
Tisa-cel	2 (12,5%)
Transformed Follicular Lymphoma	4 (25%)
Axi-cel	4 (25%)
Follicular Lymphoma	2 (12,5%)
Tisa-cel	2 (12,5%)

Supplemental Table IF: Cohort II patient characteristics

Leukapheresis Lymphocyte population	Whole Population n = 81	DLBCL and Tf Foll. Axi-cel n = 47	DLBCL Tisa-cel n = 7	M.Myeloma Ide-cel n = 11	M.Myeloma Cilta- cel n = 3	Foll. Lymphoma Tisa-cel n = 5	Mantle Cell Lymphoma Brexu-cel n = 8
CD3 Lymphocyte ¹ → % all lymphocytes → cell/mm3	85,3 (21,3-97,9) 23170 (314-139210)	81,7 (44,4-96,7) 23260 (1641-87680)	74,3 (52,1-95,2) 24680 (1600-56680)	88 (52,5-96) 18700 (5280-139210)	86,9 (82-70,91,6) 11120 (314-31640)	85,8 (77,3-88,4) 17160 (865-56680)	90,6 (88,9-21,3-97,9) 28750 (21180-56060)
CD4 Lymphocyte ¹ → % all lymphocytes → cell/mm3	39,3 (4,7-80) 9057,5 (1884-39346)	42,5 (12,9-80) 11227 (611-39346)	36,1 (4,7-62,2) 9107 (578-22927)	31(10,6-42,9) 5749 (1051-36751)	47,4 (25,2-58,5) 5271 (184-7973)	44,8 (32,3-64,6) 10004 (559-25393)	37,4 (26,2-59,7) 11113 (9008-15880)
CCR7 CD4 Lymphocyte ¹ → % CD4 lymphocytes → cell/mm3	61,2 (3,7-94,3) 5168,9 (77-31516)	68,1 (15,1-94,3) 6592,6 (304- 31516)	52,6 (3,7-63) 3952,2 (98-12105)	56,1 (9,3-77,3) 3075 (522-16653)	42 (20-60) 1594,6 (77-3167)	49,7 (12,7-69,2) 3756,9 (386-13889)	72,8 (45-80,5) 7712,2 (6629-10870)
CD4TN Lymphocyte ¹ → % CD4 lymphocytes → cell/mm3	11,6 (0,4-73,1) 1063,1 (8,28- 17202,6)	14,5 (1,9-73,1) 1311,8 (48,3- 17202,6)	3,7 (1,4-18,9) 158,9 (37,6-1765,4)	10,5 (0,4-45) 472,9 (8,8-2198,9)	4,5 (3,8-12) 302,9 (8,3-632,5)	5,4 (2,3-17,6) 324,9 (98,4-1371,2)	18,6 (5,1-36,5) 2335,2 (459,4-4082,9)
CD4TCM Lymphocyte ¹ → % CD4 lymphocytes → cell/mm3	44,3 (0-75,6) 3498,3 (0-21522,3)	44,3 (8,5-75,6) 4026,9 (256- 21522,3)	45,1 (0-61) 3793,2 (0-10340,1)	35,6 (8,7-60) 2300,6 (140,8-14958)	37,5 (16,2-48,1) 1291,6 (69-2535,4)	44,3 (9,8-51,6) 3432,1 (288,4- 12518,8)	49,6 (19,4-68,5) 5749,6 (2968,9-8938,1)
CD4TEM Lymphocyte ¹ → % CD4 lymphocytes → cell/mm3	31 (0,1-82,2) 2381,4 (2,7-20176,5)	23,9 (4,5-82,2) 2310,6 (106,6- 20176,5)	36,5 (0,1-62,9) 2452 (2,7-8758,1)	38,4 (8,6-75,6) 2149,3 (90,4-20029,3)	55,9 (36,9-79,1) 1945 (103-6306)	46,4 (29,3-69,7) 4641,9 (163,8- 10995,2)	24,8 (16,7-53,1) 2951,7 (1868,1-8126,4)
CD4TTD Lymphocyte ¹ → % CD4 lymphocytes → cell/mm3	2,2 (0,1-96,1) 202,4 (3,2-13340,6)	2,1 (0,1 -31,8) 192,1 (3,2-8566)	7,3 (0,5-96,1) 664,8 (18,8-2560,1)	3 (0,5-36,3) 204,9 (10,9-13340,6)	2,1 (0,9-3) 71,8 (3,9-158,1)	3,7 (1,4-33,1) 507,9 (7,8-1616,6)	1,55 (0,7-14,1) 207,4 (81,1-2239,1)

CD8 Lymphocyte median ¹ → % all lymphocytes	38,4(15,2-76,2)	37,5 (15,5-74,5)	31,2(15,6-44)	50,8 (28,2-76,2)	35,9 (32,1-60,8)	33,2 (18,3-61,4)	49,8 (15,2-70,2)
→ cell/mm3	8109(101-103851)	7326 (661-46621)	6148(587-24939)	9500 (1795-103851)	3992 (101-19237)	9284 (158-18805)	14626,5 (3219-39354)
CCR7 CD8 Lymphocyte ¹ → % CD8 lymphocytes	23,2 (1,1-77,2)	25,5 (2,2-70,1)	26,5(16,4-77,2)	17,4 (1,1-58,1)	13,3 (2,4-37,4)	15,9 (2,9-29,8)	26,6 (5,3-53,1)
→ cell/mm3	1677,8 (13,4-19252,9)	1751,9 (69-18117,5)	1364,9 (136,2-19252,9)	1430 (164,1-5583,2)	461,7 (13,4-1493)	54535 (47,1-3677,9)	2375,9 (672,8-13054,6)
CD8TN Lymphocyte ¹ → % CD8 lymphocytes	12,3 (0,2-76,1)	16 (0,4-57,6)	11,5 (4,5-76,1)	9,4 (0,2-40,6)	4,3 (0,8-28)	5,2 (1,6-13,8)	7,6 (4,4-31,9)
→ cell/mm3	940,2(4,3-18978,6)	1157,8 (12,6-10991,1)	631,4 (90,4-18978,6)	683,6 (29,8-2481,4)	153,9 (4,3-1117,8)	300,9 (21,8-1464)	1489,7 (218,9-4223,9)
CD8TCM Lymphocyte ¹ → % CD8 lymphocytes	7,4 (0,3-41,4)	7,4 (0,3-37,4)	13,7 (1,1-23,1)	4,9 (0,8-17,5)	9 (1,6-9,4)	10,7 (1,3-16)	7,9 (0,9-41,4)
→ cell/mm3	520,5 (9,1-10178,2)	568,6 (34,8-7577,4)	527,5 (45,8-2997,2)	465,5 (17,9-3101,7)	307,8 (9,1-375,3)	244,5 (25,3-2213,9)	656,8 (254,2-10178,2)
CD8TEM Lymphocyte ¹ → % CD8 lymphocytes	21,3(0-69,5)	20,7 (2,4-62,7)	22,3 (0-46)	18,7 (1,2-69,5)	47,8 (23,7-58,1)	26,9 (15,7-36,4)	25,8 (11,3-42,8)
→ cell/mm3	1576,5 (0-26861,1)	1511,9 (126,9-17735,2)	857,6 (0-3775,7)	2123,1 (21,5-26861,1)	946,1 (48,3-1176,7)	2073,7 (43,8-2802,7)	4390,9 (795,1-12357,2)
CD8TTD Lymphocyte ¹ → % CD8 lymphocytes	48,2(16-91,6)	45,7 (16-91,5)	51,2 (22,8-64,3)	68 (21,5-91,6)	39 (38,9-39,5)	52,5 (42,6-78,9)	50,6 (20,1-67,1)
→ cell/mm3	3933,9 (39,3-95127,5)	3010,9 (271-39768,6)	2302,3 (377,4-5686,1)	5743 (969-95127,5)	1556,9 (39,3-7598,6)	7325,1 (67,3-13972)	5549,7 (1751,1-24911,1)
CD19 Lymphocyte ¹ → % all lymphocyte	0,1 (0-30,2)	0,1 (0-30,2)	4 (0-19,7)	0,6 (0-10,4)	1,7 (0,7-3,3)	0,1 (0-1,3)	0,1 (0-14,5)
CD16/56 Lymphocyte ¹ → % all lymphocyte	13,5 (1 -52,4)	16,8 (2,4-52,4)	10,9 (1-38,7)	8,9 (1,6-45,6)	11,3 (4,9-16,1)	13,7 (10-21)	8,9 (1,9-21,3)

Supplemental Table IIA: Cohort I leukapheresis characteristics

Abbreviations : Foll. Lymphoma, Follicular Lymphoma ; M.Myeloma, Multiple Myeloma ; Tf Foll. , Transformed Follicular Lymphoma.

¹: Presented in median (range).

CAR-T cells population	Whole population n = 81	DLBCL and Tf Foll. Axi-cel n = 47	DLBCL Tisa-cel n = 7	M.Myeloma Ide- cel n = 11	M.Myeloma Cilta-cel n = 3	Foll. Lymphoma Tisa-cel n = 5	Mantle Cell Lymphoma Brexu-cel n = 8
Transduction rate → % all T Lymphocytes	65,36 (0,5-100)	68,57 (25,2-86,6)	15,6 (7,4-34,2)	40,6 (0,6-100)	99,7 (0,5-99,9)	22,7 (18,4-32,5)	76,7 (30,5-90,2)
CD4 CAR-T cells → % all CAR-T cells	50,9(1-89,5)	47,5 (1,99-86,1)	74,1 (47,8-86,3)	69,7 (18,8-83,7)	41,6 (1-77,5)	80(48,3-89,5)	51,6 (33,9-75,7)
CD8 CAR-T cells → % all CAR-T cells	40,3 (1,3-87)	48 (13,5-87)	20,7 (10,9-59,6)	18,4 (1,3-41,7)	20,6 (16,5-58)	19,5 (9,9-50,4)	47,3 (23-59,9)
CD4+8+ CAR-T cells → % all CAR-T cells	1,4 (0-82,5)	1 (0-65,7)	2,5 (0-12,8)	10,3 (0-52,3)	1,7 (0,3-82,5)	0,4 (0,1-2,2)	0,45 (0-5,3)
CD4 Lymphocytes → % all CD3 non CAR-T cells	48,1 (0-88,2)	39,1 (1,6-79,1)	72,2 (52,4-83,6)	60,9 (0-71,9)	47,7 (0,3-88,2)	82,9 (44,9-86,4)	54,1 (37,2-78,2)
CD8 Lymphocytes → % all CD3 non CAR-T cells	44,2 (0-86,4)	57,3 (20,3-86,4)	26 (14,8-45,1)	23 (0-71,9)	27,7 (11,8-83)	16,1 (12,8-53,5)	42,6 (20,4-55,3)

Supplemental Table IIB: Cohort I CAR-T cell product characteristics

Abbreviations : DLBCL, Diffuse Large B cell Lymphoma ; Foll. Lymphoma, Follicular Lymphoma; M.Myeloma, Multiple Myeloma ;Tf Foll. , Transformed Follicular Lymphoma.

¹: Presented in median (range).

Transduction rate n=(%)	CCR7 CD4 from Leukapheresis				TN CD4 from Leukapheresis				TCM CD4 from Leukapheresis			
	Low	High	Spearman R	p-value	Low	High	Spearman R	p-value	Low	High	Spearman R	p-value
Low	25 (60.9%)	16 (40%)	0.21	0.07	25 (60.9%)	16 (40%)	0.209	0.07	22 (52.4%)	20 (47.6%)	0.03	0,74
High	16 (39.02%)	24 (60%)			16 (39%)	24 (60%)			19 (48.7%)	20 (51.3%)		
Transduction rate n=(%)	CCR7 CD8 from Leukapheresis				TN CD8 from Leukapheresis				TCM CD8 from Leukapheresis			
	Low	High	Spearman R	p-value	Low	High	Spearman R	p-value	Low	High	Spearman R	p-value
Low	21 (50%)	21 (50%)	-0.046	0.68	22 (53.7%)	19 (46.3%)	0.006	0.58	18 (43.9%)	23 (56.1%)	0.13	0.22
High	20 (51.3%)	19 (48.7%)			19 (47.5%)	21 (52.5%)			23 (57.5%)	17 (42.5%)		

Supplemental Table IIC: Spearman correlation test results for High (above median) vs Low (below median) Transduction rate with Leukapheresis immature subsets in Cohort I

Lymphocyte population	n = 16 median (range)
CD3 Lymphocytes ¹ → CD4 Lymphocytes ² → CD8 Lymphocytes ²	84.05 (60.1-93) 46 (12.9-64.6) 34.95 (18.3-66.2)
CCR7 Lymphocytes → CD4 Lymphocytes ³ → CD8 Lymphocytes	66.1 (42.8-92.3) 26.5 (2.2-70.1)
TN Lymphocytes → CD4 Lymphocytes ³ → CD8 Lymphocytes ⁴	8.1 (2-35,9) 14.6 (0.4-57.6)
TCM Lymphocytes → CD4 Lymphocytes ³ → CD8 Lymphocytes ⁴	49.85 (33.6-74,5) 9.45 (1,80-37.4)
TEM Lymphocytes → CD4 Lymphocytes ³ → CD8 Lymphocytes ⁴	25,8 (7,3-54,2) 20,1 (9,5-54,5)
TTD Lymphocytes → CD4 Lymphocytes ³ → CD8 Lymphocytes ⁴	1,85 (0,3-31,8) 46,7 (16-80,5)
CD19 Lymphocytes ¹	0,15(0-16,1)
CD16/56 Lymphocytes ¹	14,15 (4,8-38,7)

Supplemental Table IIIA: Cohort II Leukapheresis characteristics

¹ As a percentage of all Lymphocytes.

² As a percentage of all T cells.

³ As a percentage of CD4 T cells.

⁴ As a percentage of CD8 T cells.

CAR-T cells population	n=16 Median (Range)
CAR-T cells → CD3 CAR-T cells ¹ → CD4 CAR-T cells ² → CD8 CAR-T cells ²	63.9 (7,68 ; 80,84) 49,9 (23,4 ; 89,5) 47,3 (9,9 ; 75)
CCR7 CAR-T cells → CD4 CAR-T cells ³ → CD8 CAR-T cells ⁴	55.47 (18.9-91.2) 45.87 (9.9 -92.1)
TN CAR-T cells → CD4 CAR-T cells ³ → CD8 CAR-T cells ⁴	1.42 (0.2-7.8) 6.37 (0.06-36.99)
TCM CAR-T cells → CD4 CAR-T cells ³ → CD8 CAR-T cells ⁴	55.1 (17.5-86.2) 35.02 (5.7-79.6)
TEM CAR-T cells → CD4 CAR-T cells ³ → CD8 CAR-T cells ⁴	44.51 (8.8-79.5) 46.23 (7.3-81.16)
TTD CAR-T cells → CD4 CAR-T cells ³ → CD8 CAR-T cells ⁴	0.25 (0.02-2.6) 2.27 (0.1-37.39)
Non CAR Lymphocytes → CD4 Lymphocytes % non CAR-T cells ⁵ → CD8 Lymphocytes % non CAR-T cells ⁵	41,4 (14,5-86,4) 55,85 (12,8-83,8)

Supplemental Table IIIB: Cohort II CAR-T characteristics

¹ As a percentage of all T cells.

² As a percentage of all CAR-T cells.

³ As a percentage of CD4 CAR-T cells.

⁴ As a percentage of CD8 CAR-T cells.

⁵ As a percentage of non CAR-T cells Lymphocyte.

Prior lines of treatment	≤ 2 n=15 (46.9%)	>2 n=17 (53.1%)	P value²
CD4 TN from leukapheresis ¹	12.8 [6.6 ;27.1]	23.1 [5.6 ;28.8]	0.97
CD8 TN from leukapheresis ¹	18.7 [12.3 ;29.8]	9.5 [5.2 ;13.5]	0.10
CCR7 CD4 from leukapheresis ¹	68.1 [49.8 ;79.2]	51.6 [37.2 ;78.6]	0.64
CCR7 CD8 from leukapheresis ¹	25.6 [13.8 ;39.8]	21.0 [11.9 ;23.8]	0.13
CMV Serology	Negative n=17 (53.1%)	Positive n=15 (46.9%)	P value²
CD4 TN from leukapheresis ¹	12.8 [5.6 ;25.6]	23.1 [6.6 ;35.9]	0.32
CD8 TN from leukapheresis ¹	16.9 [5.2 ;29.8]	12.3 [7.5 ;21.4]	0.37
CCR7 CD4 from leukapheresis ¹	67.8 [49.2 ;76.8]	68.1 [35.4 ;82.3]	0.72
CCR7 CD8 from leukapheresis ¹	23.2 [13.8 ;43.8]	23.8 [11.9 ;28.0]	0.35
Gender	Male n=22 (68.8%)	Female n=10 (31.3%)	P value²
CD4 TN from leukapheresis ¹	13.8 [5.6 ;27.1]	14.3 [11.3 ;28.8]	0.50
CD8 TN from leukapheresis ¹	12.4 [5.2 ;19.4]	20.2 [7.5 ;31.0]	0.31
CCR7 CD4 from leukapheresis ¹	66.3 [37.2 ;77.5]	72.8 [49.9 ;82.3]	0.54
CCR7 CD8 from leukapheresis ¹	23.1 [13.8 ;28.0]	27.6 [11.9 ;49.0]	0.39

Supplemental Table IV: Aging factor and gender impact on Leukapheresis subsets in Cohort III

Abbreviations : CCR7, CCR7 T cell ; CR, Complete Response rate; TN, Naive T cell.

¹: As a percentage of total T cell population, median [Interquartile Range].

²: P values are two-sided with 5% significance level.

Age at Leukapheresis	Correlation Coefficient Rho ¹	P value ²
CD4 TN from leukapheresis ¹	0.3	0.09
CD8 TN from leukapheresis ¹	0.01	0.94
CCR7 CD4 from leukapheresis ¹	0.26	0.16
CCR7 CD8 from leukapheresis ¹	0.05	0.79

Supplemental Table V: Aging factor and gender impact on Leukapheresis subsets in Cohort III

Abbreviations : CCR7, CCR7 T cells ; TN, Naive T cell.

¹: Correlation Coefficient Rho is calculated by Spearman Correlation test.

²: P values are two-sided with 5% significancy level.

DISCUSSION

Le but de notre travail était d'étudier l'intérêt de l'immunophénotypage lymphocytaire en pratique clinique, qu'il soit réalisé sur prélèvement de leucaphérèse, poche de CAR-T cells ou après réinjection au patient. Nous avons ainsi pu suivre l'évolution des sous-populations lymphocytaires tout au long de la fabrication des CAR-T cells, jusqu'à la réinjection. Nous avons cherché à évaluer si la surreprésentation d'une sous population impacte le devenir des patients.

Étude du taux de transduction

Une de nos hypothèses était qu'un taux de lymphocytes immatures (naïfs ou CCR7 +) élevé dans le produit de leucaphérèse permettrait d'obtenir un taux de CAR-T cells plus élevé dans la poche de CAR-T cells (taux de transduction).

Dans la cohorte I, même s'il existe une tendance en faveur d'un taux de transduction plus élevé si les CAR-T cells sont produits à partir d'une leucaphérèse riche en lymphocytes T CD4 naïfs, nous ne retrouvons pas d'association statistique entre les sous-populations naïves, centrales mémoires ou CCR7 du produit de leucaphérèse et le taux de transduction. L'absence de significativité pourrait être due à un manque d'effectif ou liée à l'hétérogénéité de notre cohorte, qui inclut des patients traités pour des hémopathies différentes et par plusieurs CAR-T cells. Cependant, dans la Cohorte III réinjectée uniquement par Axi-cel, le taux de transduction n'est pas corrélé aux sous-populations immatures. De plus, le taux de transduction dans cette cohorte n'est ni associé à la réponse au traitement, ni aux effets indésirables d'intérêts (CRS de grade >1, neurotoxicité liées au CAR-T cells, anémie/thrombopénie de grade >2).

Des résultats similaires sont rapportés par Štach et al., qui ne retrouvent pas d'association entre le taux de Transduction et la réponse au traitement sur une cohorte de 32 patients traités par Tisa-cel pour Lymphomes B à Grandes Cellules et des Leucémies Aigues Lymphoblastiques B. (159) Il est donc possible que le taux de transduction ne soit pas corrélé aux cellules immatures du produit de leucaphérèse du fait de la complexité des mécanismes de fabrication des CAR-T cells. En effet les multiples étapes d'activations lymphocytaires lors de la fabrication des CAR-T

cells pourraient modifier la répartition des sous-populations lymphocytaires T.

Étude de l'évolution des sous-populations lymphocytaires de la leucaphérèse à la poche de CAR-T cells

En comparant le produit de leucaphérèse et la poche de CAR-T cells, on remarque une augmentation du taux de cellules mémoires TCM et TEM au dépend des TN et TTD. Cette orientation vers un phénotype mémoire est probablement liée aux étapes d'activation lymphocytaire lors de la production des CAR-T cells.

En effet, lors des étapes de fabrication des CAR-T cells, les lymphocytes du patients sont mis en culture en présence de cytokines, notamment l'IL-2 afin de permettre leur survie et leur expansion. L'IL-2 favorise l'orientation du phénotype lymphocytaire T vers un phénotype mémoire (51,54,160). Le phénotype des CAR-T cells devient donc majoritairement composé de cellules à haut potentiel réplicatif telles les TCM et les TEM. À l'inverse les TTD ayant perdu leurs capacités de prolifération seront sous-représentés. Ceci est d'autant plus vrai pour les CAR-T cells possédant un domaine de costimulation 4-1BB (Tisa-cel). En effet, il a été montré que lors des étapes d'activation, le fait de posséder un domaine 4-1 BB augmente l'expression du CCR7 en comparaison aux CAR-T cells possédant un domaine de costimulation CD28 (Axi-cel), ce qui oriente la différenciation des lymphocytes TN vers un phénotype TCM. (161) Les effectifs étant réduits dans la cohorte II, la comparaison entre CAR-T cells 4-1BB et CD28 est complexe.

Ainsi, même s'ils sont préliminaires, nos résultats illustrent le rôle prépondérant que jouent les étapes de fabrication dans le phénotype des CAR-T cells et expliquent qu'à lui seul le phénotype lymphocytaire de la poche d'aphérèse ne soit pas à même d'expliquer l'efficacité de la transduction. Monfrini et al. ont analysé 38 poches de CAR-T cells (16 Tisa-cel et 22 Axi-cel) et montré une différence en termes de répartition des sous-populations de CAR-T cells. Cette différence est cependant gommée devant une cinétique d'expansion in vivo similaire entre les 2 CAR-T cell après réinjection. (162) L'immunophénotypage des sous-populations lymphocytaires sur poche de CAR-T cells n'étant pas réalisé en routine, l'ensemble de ces données doit être validé sur de plus larges cohortes en vie réelle.

Impact des sous-populations du produit de leucaphérèse sur l'efficacité du traitement par Axi-cel

Du fait des contraintes liées à la fabrication des CAR-T cells (complexité du circuit, délais de fabrication, coût élevé), du risque de rechute à distance de la réinjection et des effets indésirables induits, le traitement par CAR-T cell est toujours discuté en amont. L'utilisation de marqueurs prédictifs pourrait simplifier la décision du clinicien à valider ou non la réinjection des CAR-T cells. Dans notre étude, nous ne retrouvons pas d'association significative entre les différentes sous-populations du produit de leucaphérèse et le taux de réponse complète à 1 et 3 mois.

Sur ce point, nos résultats sont rejoints par ceux de Xu et al. qui ne retrouvent pas d'association entre les sous-populations immatures du produit de leucaphérèse et la réponse au traitement chez 14 patients traités par CAR-T cells anti-CD19 dans le cadre de la prise en charge de Lymphomes B. (163) Les travaux de Sauter et al. retrouvent même une augmentation du taux de rechute si le produit de leucaphérèse est riche en Lymphocytes T CD8 de phénotype naïf.(164) Cependant nos résultats sont contradictoires avec plusieurs travaux antérieurs comme ceux de Fraietta et al. qui retrouvent une association significative entre un taux important de TCM CD8 du produit de leucaphérèse avec le taux de réponse du Tisa-cel (CTL019) chez une quarantaine de patients pris en charge pour Leucémies Lymphoïdes chroniques.(128) Ces résultats sont rejoints par ceux de Cuffel et al. qui retrouvent une corrélation entre le taux de TN CD8 du produit de leucaphérèse et la réponse au traitement sur une cohorte de 30 patients traités par Tisa-cel pour Lymphomes B à Grandes Cellules ; (130) ceux de Štách et al. retrouvent une corrélation entre le taux de TN CD8 du produit de leucaphérèse et la réponse au traitement sur une cohorte de 32 patients traités par Tisa-cel pour Lymphomes B à Grandes Cellules et des Leucémies Aigues Lymphoblastiques B (159) et ceux de Cohen et al. qui retrouvent une association significative entre le taux de TCM CD8 du produit de leucaphérèse chez 25 patients traités par CAR-T cells anti-BCMA dans le cadre de la prise en charge de Myélomes multiples en rechute. (132)

De nombreux travaux montrent l'importance de la richesse en TN CD8 du produit de CAR-T cells

avec la réponse au traitement, notamment les données des essais randomisés ZUMA-1 et ZUMA-7 étudiant l'Axi-cel dans le cadre de la prise en charge des Lymphomes à Grandes Cellules B. (162,165,166) Les travaux de Rossi et al. montrent l'importance d'associer aux CAR-T cells CD8, des CAR-T cells CD4 dits polyfonctionnels et corrélés à la réponse au traitement mais également à la toxicité du traitement. (167)

Les Lymphocytes T CD4 naïfs du produit de leucaphérèse sont prédictifs du risque de CRS de grade > 1

Dans notre étude, un taux important de lymphocytes TN CD4 dans le produit de leucaphérèse est corrélé au risque de Syndrome de Relargage de Cytokine de grade > 1, c'est-à-dire nécessitant l'initiation d'un traitement par TOCILIZUMAB, surveillance rapprochée voire transfert en réanimation. Ce risque de CRS est relié à une plus grande expansion in vivo car le taux de lymphocytes CD4 naïfs est également corrélé au taux de CAR-T cells à J7. Ce taux de CAR-T cells à J7 étant lui-même associé au risque de CRS de grade >1.

Le taux de Lymphocyte CD8 CCR7 du produit de leucaphérèse est prédictif du risque d'anémie de grade ≥ 3

Dans notre étude, le taux de Lymphocyte CD8 CCR7 (TN et TCM) du produit de leucaphérèse est significativement corrélé à la survenue d'une anémie de grade ≥ 3 .

On observe une tendance pour le taux de lymphocytes T CD8 naïfs ($p = 0,064$) sans différence significative, possiblement liée à un manque d'effectif. En revanche, nous n'avons pas retrouvé d'association entre les sous-populations CD8 CCR7 et le risque de thrombopénie de grade ≥ 3 , malgré l'incidence similaire avec les anémies de grade >3 . Les cytopénies débutant dans les jours suivant la réinjection des CAR-T cells sont de mécanismes plurifactoriels, liées à une infiltration médullaire de l'hémopathie, à la toxicité induite par la lymphodéplétion ou le traitement de bridging, mais également par la sidération médullaire induite par l'inflammation lors des Syndromes de Relargage de Cytokines ou des Syndromes d'Activation Macrophagique. (168,169)

Ainsi dans notre étude, il apparaît que l'immunophénotypage lymphocytaire est un examen sensible pour prédire la toxicité hématologique érythrocytaire, en amont des marqueurs

habituellement utilisés tels que la NFS, la CRP et le dosage de la Ferritine avant lymphodéplétion (Score CAR-HEMATOTOX). (65)

Analyse des marqueurs d'expansion des CAR-T cells

Dans notre étude, l'expansion évaluée par le taux de CAR-T à J7 est corrélée au risque de CRS de grade >1 avec un effet seuil à 59 cellules/mm³. Le pic de CAR-T cells n'est cependant pas corrélé au risque de CRS de grade >1 probablement du fait d'un manque d'effectif ($p = 0,051$) et des contraintes techniques ou du fait que l'évaluation de l'expansion par une mesure ponctuelle comme le pic de CAR-T cells n'est pas si aisément réalisable en conditions de vie réelle. L'évaluation du taux de CAR-T cells à J7 reflète bien l'expansion in vivo, mais ne peut servir de marqueur prédictif de CRS de grade >1, du fait de l'apparition des CRS (médiane à J1) et son évolution à un grade maximal (médiane à J3) de manière beaucoup plus précoce que cette mesure à J7. En revanche, le taux de CAR-T cells à J7 pourrait servir de marqueur de confirmation diagnostique face au principal diagnostic différentiel que représente l'infection chez ces patients neutropéniques et immunodéprimés à ce moment de la prise en charge. Nos résultats sont en accord avec les travaux de Boulch et al. qui retrouvent, en modèle murin, une corrélation entre l'expansion in vivo de CAR-T cells CD4 et le risque de CRS. Cette corrélation est confirmée sur leur cohorte rétrospective de 76 patients traités par Axi-cel ($n=44$) et Tisa-cel ($n=32$) pour des Lymphome B diffus à Grandes Cellules. (170) Des résultats similaires sont retrouvés par Bove et al. en modèle murin avec incidence plus importante de CRS si les CAR-T cells CD4 possèdent un domaine de costimulation CD28 en comparaison à un domaine de costimulation 4-1BB. (171)

Dans notre étude, nous ne retrouvons pas d'association entre marqueurs d'expansion (CAR-T cells à J7 et pic) et réponse au traitement, tout comme le montrent Schuster et al. dans l'essai JULIET étudiant le Tisa-cel dans le cadre de la prise en charge des Lymphomes à Grandes cellules B. (26)

Cependant, nos résultats et ceux de Schuster vont à l'encontre de plusieurs travaux (essais ZUMA-1, ZUMA-2) et en vie réelle qui retrouvent une corrélation entre expansion des CAR-T

cells in vivo et amélioration du taux de survie. (29,162,166,167)

Les travaux de Good et al. permettent de mieux comprendre cette disparité des résultats. En effet, en analysant les sous-populations de CAR-T cells circulants, ceux-ci concluent à une absence de corrélation entre réponse et expansion lorsque les CAR-T cells présents lors de l'expansion sont majoritairement de phénotype T régulateurs. À l'inverse, ils retrouvent une association entre réponse et expansion en cas de faible proportion de CAR-T cells de phénotype T régulateurs circulants lors de l'expansion. (172)

Dans notre étude, la majorité des patients sont en maladie progressive au moment de la réinjection avec une masse tumorale qui est donc plus importante que les patients en réponse. La masse tumorale est un facteur associé à l'absence de réponse lors du traitement par CAR-T cells (159,173,174). Il a également été démontré que cette masse tumorale était responsable d'une plus grande expansion des CAR-T cells après réinjection. (58,166) Ceci pourrait expliquer pourquoi nous n'avons pas retrouvé d'association statistique significative entre nos marqueurs d'expansion (pic, taux de CAR-T cells à J7) et de réponse, malgré l'association statistique significative retrouvée entre le taux de CAR-T cells à J7 et le risque de CRS de grade >1.

Enfin, l'analyse des Lymphocytes T et CAR-T cells nécessiterait une approche globale par immunophénotypage, associée à d'autres analyses complémentaires comme l'étude des marqueurs d'exhaustion, du métabolisme lymphocytaire et des données de génétique moléculaire, difficilement applicables en pratique courante. (175)(176–178)(179,180)

Limites de notre étude

Nos résultats ont été obtenus sur une population de patients traités par Axi-cel et ne sont donc pas généralisables à d'autres CAR-T cells.

Un grand nombre de patients n'ont pas pu être analysés du fait de la non-réalisation des prélèvements sur produit de leucaphérèse et poche de CAR-T cells. En effet, les premiers prélèvements sur poche de CAR-T cells ont été complexes à mettre en place dans le service clinique. L'absence de recommandations sur les techniques à employer (phase pré-analytique,

marquage du CAR) pour l'immunophénotypage sur produit de leucaphérèse puis sur poche de CAR-T cells a également été responsable d'une diminution de patients analysables sur le plan biologique, surtout au début de notre étude. Cette limite nous a cependant permis de mettre en place des bases techniques qui permettront de réaliser ces analyses en routine. (94)

Le caractère rétrospectif et l'effectif réduit limitent l'interprétation de nos données. Cependant, notre cohorte représente une des plus importantes pour l'analyse des sous-populations du produit de leucaphérèse en condition de vie réelle.

Conclusion

La richesse du produit de leucaphérèse en lymphocytes T CD4 naïfs est un marqueur prédictif du risque de CRS de grade > 1 . Le risque d'anémie de grade ≥ 3 est lui en lien avec la richesse du produit de leucaphérèse en lymphocytes T CD8 CCR7. Nous ne retrouvons pas de lien évident entre population du produit de leucaphérèse et réponse au traitement. L'expansion des CAR-T cells in vivo est mieux approchée par la mesure du taux de CAR-T cells à J7 que par celle du pic de CAR-T cells. Ce taux de CAR-T cells à J7 pourrait servir de marqueur de confirmation de Syndrome de Relargage de Cytokine de grade >1 en contexte de neutropénie fébrile pouvant également orienter vers une problématique infectieuse. Ces résultats doivent être confirmés sur une cohorte plus importante afin de valider ces valeurs seuils et d'éventuellement mettre en place des stratégies de prévention ou d'atténuation de ces effets indésirables. (181,182)

BIBLIOGRAPHIE

1. Chabannon C, Larghero J. Réglementations applicables aux CAR-T cells : comment les établissements de santé français peuvent-ils s'organiser pour participer à la production et permettre la délivrance de ces immunothérapies innovantes ? Bull Cancer (Paris). déc 2018;105:S198-204.
2. Zhang C, Liu J, Zhong JF, Zhang X. Engineering CAR-T cells. Biomark Res. déc 2017;5(1):22.
3. Ardigen [Internet]. Disponible sur: <https://ardigen.com/future-perspectives-for-car-t-cell-therapies/>
4. Uckun FM, Jaszcz W, Ambrus JL, Fauci AS, Gajl-Peczalska K, Song CW, et al. Detailed studies on expression and function of CD19 surface determinant by using B43 monoclonal antibody and the clinical potential of anti-CD19 immunotoxins. Blood. janv 1988;71(1):13-29.
5. Sadelain M, Rivière I, Riddell S. Therapeutic T cell engineering. Nature. 25 mai 2017;545(7655):423-31.
6. Hicklin DJ, Marincola FM, Ferrone S. HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. Mol Med Today. avr 1999;5(4):178-86.
7. Courtney AH, Lo WL, Weiss A. TCR Signaling: Mechanisms of Initiation and Propagation. Trends Biochem Sci. 1 févr 2018;43(2):108-23.
8. Distinct NF- κ B activation pathways engaged by T-cell receptor and co-receptor CD28 on T-cells. Inflamm Cell Signal [Internet]. 2 mai 2015 [cité 8 juill 2023]; Disponible sur: <http://www.smartscitech.com/index.php/ICS/article/view/613>
9. Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. Cytokine. juill 2015;74(1):5-17.
10. Leung S, Liu X, Fang L, Chen X, Guo T, Zhang J. The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease. Cell Mol Immunol. mai 2010;7(3):182-9.
11. Cheadle EJ, Sheard V, Rothwell DG, Bridgeman JS, Ashton G, Hanson V, et al. Differential role of Th1 and Th2 cytokines in autotoxicity driven by CD19-specific second-generation chimeric antigen receptor T cells in a mouse model. J Immunol Baltim Md 1950. 15 avr 2014;192(8):3654-65.
12. Xhangolli I, Dura B, Lee G, Kim D, Xiao Y, Fan R. Single-cell Analysis of CAR-T Cell Activation Reveals A Mixed TH1/TH2 Response Independent of Differentiation. Genomics Proteomics Bioinformatics. avr 2019;17(2):129-39.
13. Rubio MT, Galaine J, Borg C, Daguindau É. Biologie, concepts et principes des CAR-T cells. Bull Cancer (Paris). 1 déc 2018;105:S135-46.
14. Milone MC, OConnor R, May M, Albelda S, Philipson B. 4-1BB-Costimulated CAR-Mediated Non-Canonical NF- κ B Signaling Enhances CAR T Cell Survival and Suppresses Bim Expression. Blood. 29 nov 2018;132(Supplement 1):3713.
15. Boulch M, Cazaux M, Loe-Mie Y, Thibaut R, Corre B, Lemaître F, et al. A crosstalk between CAR T cell subsets and the tumor microenvironment is essential for sustained cytotoxic activity. Sci Immunol. 26 mars 2021;6(57):eabd4344.
16. 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.
17. 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. déc 1989;86(24):10024-8.
18. 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. 15

janv 1993;90(2):720-4.

19. Tomasik J, Jasiński M, Basak GW. Next generations of CAR-T cells - new therapeutic opportunities in hematology? *Front Immunol.* 28 oct 2022;13:1034707.
20. Krause A, Guo HF, Latouche JB, Tan C, Cheung NKV, Sadelain M. Antigen-dependent CD28 Signaling Selectively Enhances Survival and Proliferation in Genetically Modified Activated Human Primary T Lymphocytes. *J Exp Med.* 17 août 1998;188(4):619-26.
21. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, et al. Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells for Acute Lymphoid Leukemia. *N Engl J Med.* 18 avr 2013;368(16):1509-18.
22. 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.
23. 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.
24. Locke FL, Miklos DB, Jacobson CA, Perales MA, Kersten MJ, Oluwole OO, et al. Axicabtagene Ciloleucel as Second-Line Therapy for Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med.* 17 févr 2022;386(7):640-54.
25. Jacobson CA, Chavez JC, Sehgal AR, William BM, Munoz J, Salles G, et al. Axicabtagene ciloleucel in relapsed or refractory indolent non-Hodgkin lymphoma (ZUMA-5): a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* janv 2022;23(1):91-103.
26. 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.
27. Fowler NH, Dickinson M, Dreyling M, Martinez-Lopez J, Kolstad A, Butler J, et al. Tisagenlecleucel in adult relapsed or refractory follicular lymphoma: the phase 2 ELARA trial. *Nat Med.* févr 2022;28(2):325-32.
28. Walton M, Sharif S, Simmonds M, Claxton L, Hodgson R. Tisagenlecleucel for the Treatment of Relapsed or Refractory B-cell Acute Lymphoblastic Leukaemia in People Aged up to 25 Years: An Evidence Review Group Perspective of a NICE Single Technology Appraisal. *PharmacoEconomics.* oct 2019;37(10):1209-17.
29. Wang M, Munoz J, Goy A, Locke FL, Jacobson CA, Hill BT, et al. KTE-X19 CAR T-Cell Therapy in Relapsed or Refractory Mantle-Cell Lymphoma. *N Engl J Med.* 2 avr 2020;382(14):1331-42.
30. Shah BD, Ghobadi A, Oluwole OO, Logan AC, Boissel N, Cassaday RD, et al. KTE-X19 for relapsed or refractory adult B-cell acute lymphoblastic leukaemia: phase 2 results of the single-arm, open-label, multicentre ZUMA-3 study. *Lancet Lond Engl.* 7 août 2021;398(10299):491-502.
31. Kamdar M, Solomon SR, Arnason J, Johnston PB, Glass B, Bachanova V, et al. Lisocabtagene maraleucel versus standard of care with salvage chemotherapy followed by autologous stem cell transplantation as second-line treatment in patients with relapsed or refractory large B-cell lymphoma (TRANSFORM): results from an interim analysis of an open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet.* 18 juin 2022;399(10343):2294-308.
32. Abramson JS, Palomba ML, Gordon LI, Lunning MA, Wang M, Arnason J, et al. Lisocabtagene maraleucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): a multicentre seamless design study. *The Lancet.* 19 sept 2020;396(10254):839-52.
33. Raje N, Berdeja J, Lin Y, Siegel D, Jagannath S, Madduri D, et al. Anti-BCMA CAR T-Cell Therapy bb2121 in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med.* 2 mai 2019;380(18):1726-37.
34. Munshi NC, Anderson LD, Shah N, Madduri D, Berdeja J, Lonial S, et al. Idecabtagene Vicleucel in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med.* 25 févr 2021;384(8):705-16.
35. Berdeja JG, Madduri D, Usmani SZ, Jakubowiak A, Agha M, Cohen AD, et al.

- Ciltacabtagene autoleucel, a B-cell maturation antigen-directed chimeric antigen receptor T-cell therapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (CARTITUDE-1): a phase 1b/2 open-label study. *Lancet Lond Engl.* 24 juill 2021;398(10297):314-24.
36. Bonig H, C C, M L. PubMed. 2022 [cité 13 août 2023]. Providing the Starting Material to the Manufacturer of an Approved and Commercially Available Autologous CAR-T Cell Treatment. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36122046/>
 37. CHU de Genève [Internet]. Disponible sur: <https://www.hug.ch/hematologie/therapie-par-cellules-car-t>
 38. Qayed M, McGuirk JP, Myers GD, Parameswaran V, Waller EK, Holman P, et al. Leukapheresis guidance and best practices for optimal chimeric antigen receptor T-cell manufacturing. *Cytotherapy.* sept 2022;24(9):869-78.
 39. Tisagenlecleucel Therapy: Nursing Considerations for the Outpatient Setting - ScienceDirect [Internet]. [cité 15 mars 2023]. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749208121000693>
 40. Ceppi F, Rivers J, Annesley C, Pinto N, Park JR, Lindgren C, et al. Lymphocyte apheresis for chimeric antigen receptor T-cell manufacturing in children and young adults with leukemia and neuroblastoma. *Transfusion (Paris).* 2018;58(6):1414-20.
 41. Paroder M, Le N, Pham HP, Thibodeaux SR. Important aspects of T-cell collection by apheresis for manufacturing chimeric antigen receptor T cells. *Adv CELL GENE Ther.* 2020;3(1):e75.
 42. Korell F, Laier S, Sauer S, Veelken K, Hennemann H, Schubert ML, et al. Current Challenges in Providing Good Leukapheresis Products for Manufacturing of CAR-T Cells for Patients with Relapsed/Refractory NHL or ALL. *Cells.* mai 2020;9(5):1225.
 43. Perez Perez A, Bachmeier CA, Smilee R, Ribickas AJ, Lazaryan A, Chavez JC, et al. Factors Affecting Lymphocyte Collection Efficiency and Manufactured Product Specification during Leukapheresis for Diffuse Large B Cell Lymphoma Patients Treated with Commercial Tisagenlecleucel. *Blood.* 5 nov 2020;136:4-5.
 44. Yakoub-Agha I, Chabannon C, Bader P, Basak GW, Bonig H, Ciceri F, et al. Management of adults and children undergoing chimeric antigen receptor T-cell therapy: best practice recommendations of the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) and the Joint Accreditation Committee of ISCT and EBMT (JACIE). *Haematologica.* févr 2020;105(2):297-316.
 45. Tuazon SA, Li A, Gooley T, Eunson TW, Maloney DG, Turtle CJ, et al. Factors affecting lymphocyte collection efficiency for the manufacture of chimeric antigen receptor T cells in adults with B cell malignancies. *Transfusion (Paris).* mai 2019;59(5):1773-80.
 46. Wang X, Rivière I. Clinical manufacturing of CAR T cells: foundation of a promising therapy. *Mol Ther - Oncolytics.* 2016;3:16015.
 47. Allen ES, Stroncek DF, Ren J, Eder AF, West KA, Fry TJ, et al. Autologous lymphapheresis for the production of chimeric antigen receptor T cells. *Transfusion (Paris).* 2017;57(5):1133-41.
 48. Stroncek DF, Ren J, Lee DW, Tran M, Frodigh SE, Sabatino M, et al. Myeloid cells in peripheral blood mononuclear cell concentrates inhibit the expansion of chimeric antigen receptor T cells. *Cytotherapy.* 1 juill 2016;18(7):893-901.
 49. Noaks E, Peticone C, Kotsopoulou E, Bracewell DG. Enriching leukapheresis improves T cell activation and transduction efficiency during CAR T processing. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 6 févr 2021;20:675-87.
 50. Wang X, Rivière I. Clinical manufacturing of CAR T cells: foundation of a promising therapy. *Mol Ther - Oncolytics.* 2016;3:16015.
 51. Gong W, Hoffmann JM, Stock S, Wang L, Liu Y, Schubert ML, et al. Comparison of IL-2 vs IL-7/IL-15 for the generation of NY-ESO-1-specific T cells. *Cancer Immunol Immunother.* 1 juill 2019;68(7):1195-209.
 52. Watanabe N, McKenna MK. Generation of CAR T-cells using γ -retroviral vector. *Methods Cell Biol.* 2022;167:171-83.

53. McGarrity GJ, Hoyah G, Winemiller A, Andre K, Stein D, Blick G, et al. Patient monitoring and follow-up in lentiviral clinical trials. *J Gene Med.* févr 2013;15(2):78-82.
54. Markley JC, Sadelain M. IL-7 and IL-21 are superior to IL-2 and IL-15 in promoting human T cell-mediated rejection of systemic lymphoma in immunodeficient mice. *Blood.* 4 avr 2010;115(17):3508.
55. Delgado J, Roddie C, Schmitt M. Point-of-Care Production of CAR-T Cells. In: Kröger N, Gribben J, Chabannon C, Yakoub-Agha I, Einsele H, éditeurs. *The EBMT/EHA CAR-T Cell Handbook* [Internet]. Cham (CH): Springer; 2022 [cité 5 juill 2023]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK584163/>
56. Muranski P, Boni A, Wrzesinski C, Citrin DE, Rosenberg SA, Childs R, et al. Increased intensity lymphodepletion and adoptive immunotherapy--how far can we go? *Nat Clin Pract Oncol.* déc 2006;3(12):668-81.
57. Gattinoni L, Finkelstein SE, Klebanoff CA, Antony PA, Palmer DC, Spiess PJ, et al. Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8+ T cells. *J Exp Med.* 3 oct 2005;202(7):907-12.
58. Turtle CJ, Hanafi LA, Berger C, Hudecek M, Pender B, Robinson E, et al. Immunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma with a defined ratio of CD8+ and CD4+ CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells. *Sci Transl Med.* 7 sept 2016;8(355):355ra116.
59. Neelapu SS. CAR-T efficacy: is conditioning the key? *Blood.* 25 avr 2019;133(17):1799-800.
60. Mohty M, Minnema MC. Lymphodepleting Conditioning Regimens. In: Kröger N, Gribben J, Chabannon C, Yakoub-Agha I, Einsele H, éditeurs. *The EBMT/EHA CAR-T Cell Handbook* [Internet]. Cham (CH): Springer; 2022 [cité 5 juill 2023]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK584177/>
61. Turtle CJ, Hanafi LA, Berger C, Hudecek M, Pender B, Robinson E, et al. Immunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma with a defined ratio of CD8 + and CD4 + CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells. *Sci Transl Med* [Internet]. 7 sept 2016 [cité 26 févr 2023];8(355). Disponible sur: <https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.aaf8621>
62. Hirayama AV, Gauthier J, Hay KA, Voutsinas JM, Wu Q, Gooley T, et al. The response to lymphodepletion impacts PFS in patients with aggressive non-Hodgkin lymphoma treated with CD19 CAR T cells. *Blood.* 25 avr 2019;133(17):1876-87.
63. Kampouri E, Walti CS, Gauthier J, Hill JA. Managing hypogammaglobulinemia in patients treated with CAR-T-cell therapy: key points for clinicians. *Expert Rev Hematol.* avr 2022;15(4):305-20.
64. Wat J, Barmettler S. Hypogammaglobulinemia After Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-Cell Therapy: Characteristics, Management, and Future Directions. *J Allergy Clin Immunol Pract.* févr 2022;10(2):460-6.
65. Rejeski K, Perez A, Sesques P, Hoster E, Berger C, Jentzsch L, et al. CAR-HEMATOTOX: a model for CAR T-cell-related hematologic toxicity in relapsed/refractory large B-cell lymphoma. *Blood.* 16 déc 2021;138(24):2499-513.
66. Brudno JN, Kochenderfer JN. Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: recognition and management. *Blood.* 30 juin 2016;127(26):3321-30.
67. Yakoub-Agha I, Moreau AS, Ahmad I, Borel C, Hadhoum N, Masouridi-Levrat S, et al. Prise en charge pratique du syndrome de relargage des cytokines (CRS) post-CAR-T cells chez l'adulte et l'enfant : recommandation de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC). *Bull Cancer (Paris).* 1 janv 2019;106(1, Supplement):S102-9.
68. Lee DW, Gardner R, Porter DL, Louis CU, Ahmed N, Jensen M, et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood.* 10 juill 2014;124(2):188-95.
69. Sheth V, Gauthier J. Taming the Beast: CRS and ICANS after CAR T-cell therapy for ALL. *Bone Marrow Transplant.* mars 2021;56(3):552-66.
70. Zhang X, Zhu L, Zhang H, Chen S, Xiao Y. CAR-T Cell Therapy in Hematological

- Malignancies: Current Opportunities and Challenges. *Front Immunol.* 10 juin 2022;13:927153.
71. Norelli M, Camisa B, Barbiera G, Falcone L, Purevdorj A, Genua M, et al. Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrome and neurotoxicity due to CAR T cells. *Nat Med.* juin 2018;24(6):739-48.
 72. 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.
 73. Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, Cui YK, Delbrook C, Feldman SA, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet Lond Engl.* 7 févr 2015;385(9967):517-28.
 74. Hay KA, Hanafi LA, Li D, Gust J, Liles WC, Wurfel MM, et al. Kinetics and biomarkers of severe cytokine release syndrome after CD19 chimeric antigen receptor–modified T-cell therapy. *Blood.* 23 nov 2017;130(21):2295-306.
 75. Belin C, Devic P, Ayrignac X, Dos Santos A, Paix A, Sirven-Villaros L, et al. Description of neurotoxicity in a series of patients treated with CAR T-cell therapy. *Sci Rep.* 4 nov 2020;10(1):18997.
 76. Maillet D, Belin C, Moroni C, Cuzzubbo S, Ursu R, Sirven-Villaros L, et al. Evaluation of mid-term (6-12 months) neurotoxicity in B-cell lymphoma patients treated with CAR T cells: a prospective cohort study. *Neuro-Oncol.* 1 sept 2021;23(9):1569-75.
 77. Gu T, Hu K, Si X, Hu Y, Huang H. Mechanisms of immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome after CAR-T treatment. *Wires Mech Dis.* 2022;14(6):e1576.
 78. Pensato U, Guarino M, Muccioli L. The role of neurologists in the era of cancer immunotherapy: Focus on CAR T-cell therapy and immune checkpoint inhibitors. *Front Neurol.* 19 juill 2022;13:936141.
 79. Siegler EL, Kenderian SS. Neurotoxicity and Cytokine Release Syndrome After Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy: Insights Into Mechanisms and Novel Therapies. *Front Immunol.* 28 août 2020;11:1973.
 80. 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.* déc 2017;7(12):1404-19.
 81. Hay KA, Hanafi LA, Li D, Gust J, Liles WC, Wurfel MM, et al. Kinetics and biomarkers of severe cytokine release syndrome after CD19 chimeric antigen receptor-modified T-cell therapy. *Blood.* 23 nov 2017;130(21):2295-306.
 82. Velasco R, Mussetti A, Villagrán-García M, Sureda A. CAR T-cell-associated neurotoxicity in central nervous system hematologic disease: Is it still a concern? *Front Neurol.* 6 avr 2023;14:1144414.
 83. Hayden PJ, Roddie C, Bader P, Basak GW, Bonig H, Bonini C, et al. Management of adults and children receiving CAR T-cell therapy: 2021 best practice recommendations of the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) and the Joint Accreditation Committee of ISCT and EBMT (JACIE) and the European Haematology Association (EHA). *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* mars 2022;33(3):259-75.
 84. Ying Z, He T, Wang X, Zheng W, Lin N, Tu M, et al. Parallel Comparison of 4-1BB or CD28 Co-stimulated CD19-Targeted CAR-T Cells for B Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *Mol Ther Oncolytics.* 28 août 2019;15:60-8.
 85. Zhao X, Yang J, Zhang X, Lu XA, Xiong M, Zhang J, et al. Efficacy and Safety of CD28- or 4-1BB-Based CD19 CAR-T Cells in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mol Ther Oncolytics.* 24 juin 2020;18:272-81.
 86. Jain T, Knezevic A, Pennisi M, Chen Y, Ruiz JD, Purdon TJ, et al. Hematopoietic recovery in patients receiving chimeric antigen receptor T-cell therapy for hematologic malignancies. *Blood Adv.* 11 août 2020;4(15):3776-87.
 87. Drénou B, Fardel O, Fauchet R, Amiot L. La cytométrie en flux : intérêt dans le diagnostic phénotypique et le suivi des hémopathies malignes. *Ann Biol Clin (Paris).* 25 nov

2002;60(6):663-72.

88. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol* [Internet]. janv 2018 [cité 4 avr 2023];120(1). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cpim.40>
89. Verschoor CP, Lelic A, Bramson JL, Bowdish DME. An Introduction to Automated Flow Cytometry Gating Tools and Their Implementation. *Front Immunol* [Internet]. 2015 [cité 22 juill 2023];6. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2015.00380>
90. Cytométrie en flux et Tri cellulaire. [Internet]. BFA - Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative - CNRS UMR 8251. [cité 22 juill 2023]. Disponible sur: <https://bfa.u-paris.fr/cytometrie-en-flux-et-tri-cellulaire/>
91. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*. 1 sept 2008;112(5):1570-80.
92. Terrén I, Orrantia A, Vitallé J, Zenarruzabeitia O, Borrego F. NK Cell Metabolism and Tumor Microenvironment. *Front Immunol*. 24 sept 2019;10:2278.
93. 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)*. déc 2021;108(12):S53-64.
94. Demaret J, Varlet P, Trauet J, Beauvais D, Grossemy A, Hégo F, et al. Monitoring CAR T-cells using flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. mars 2021;100(2):218-24.
95. Al Barashdi MA, Ali A, McMullin MF, Mills K. Protein tyrosine phosphatase receptor type C (PTPRC or CD45). *J Clin Pathol*. sept 2021;74(9):548-52.
96. Zikherman J, Weiss A. Alternative Splicing of CD45: The Tip of the Iceberg. *Immunity*. 19 déc 2008;29(6):839-41.
97. Hermiston ML, Xu Z, Weiss A. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:107-37.
98. Henson SM, Riddell NE, Akbar AN. Properties of end-stage human T cells defined by CD45RA re-expression. *Curr Opin Immunol*. 1 août 2012;24(4):476-81.
99. Cho V, Mei Y, Sanny A, Chan S, Enders A, Bertram EM, et al. The RNA-binding protein hnRNPLL induces a T cell alternative splicing program delineated by differential intron retention in polyadenylated RNA. *Genome Biol*. 2014;15(1):R26.
100. Zikherman J, Weiss A. Antigen receptor signaling in the rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther*. févr 2009;11(1):1-9.
101. Altin JG, Sloan EK. The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. *Immunol Cell Biol*. oct 1997;75(5):430-45.
102. Saint-Paul L, Nguyen CH, Bastie JN, Delva L, Quéré R. CD45, une protéine phosphatase cible importante dans le traitement des leucémies aiguës myéloblastiques. *médecine/sciences*. 1 déc 2016;32(12):1051-3.
103. Alrumaihi F. The Multi-Functional Roles of CCR7 in Human Immunology and as a Promising Therapeutic Target for Cancer Therapeutics. *Front Mol Biosci*. 6 juill 2022;9:834149.
104. Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med*. 18 sept 2011;17(10):1290-7.
105. Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. 1 mars 2001;410(6824):50-6.
106. Gattinoni L, Speiser DE, Lichterfeld M, Bonini C. T memory stem cells in health and disease. *Nat Med*. janv 2017;23(1):18-27.
107. Tantalò DG, Oliver AJ, von Scheidt B, Harrison AJ, Mueller SN, Kershaw MH, et al. Understanding T cell phenotype for the design of effective chimeric antigen receptor T cell therapies. *J Immunother Cancer*. 25 mai 2021;9(5):e002555.
108. Liu Q, Sun Z, Chen L. Memory T cells: strategies for optimizing tumor immunotherapy. *Protein Cell*. août 2020;11(8):549-64.
109. Xu W, Larbi A. Markers of T Cell Senescence in Humans. *Int J Mol Sci*. 10 août 2017;18(8):1742.
110. Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E. The who's who of T-cell

differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol.* nov 2013;43(11):2797-809.

111. Knörck A, Schäfer G, Alansary D, Richter J, Thurner L, Hoth M, et al. Cytotoxic Efficiency of Human CD8+ T Cell Memory Subtypes. *Front Immunol.* 13 avr 2022;13:838484.

112. Gattinoni L, Klebanoff CA, Restifo NP. Paths to stemness: building the ultimate antitumour T cell. *Nat Rev Cancer.* oct 2012;12(10):671-84.

113. Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GMA, Papagno L, et al. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med.* avr 2002;8(4):379-85.

114. Weltevrede M, Eilers R, de Melker HE, van Baarle D. Cytomegalovirus persistence and T-cell immunosenescence in people aged fifty and older: A systematic review. *Exp Gerontol.* mai 2016;77:87-95.

115. Mackall C, Fleisher T, Brown M, Magrath I, Shad A, Horowitz M, et al. Lymphocyte depletion during treatment with intensive chemotherapy for cancer. *Blood.* 1 oct 1994;84(7):2221-8.

116. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, Feuerstein IM, et al. Distinctions Between CD8+ and CD4+ T-Cell Regenerative Pathways Result in Prolonged T-Cell Subset Imbalance After Intensive Chemotherapy. *Blood.* 15 mai 1997;89(10):3700-7.

117. Neelapu SS, Dickinson M, Munoz J, Ulrickson ML, Thieblemont C, Oluwole OO, et al. Axicabtagene ciloleucel as first-line therapy in high-risk large B-cell lymphoma: the phase 2 ZUMA-12 trial. *Nat Med.* avr 2022;28(4):735-42.

118. Koch S, Larbi A, Derhovanessian E, Ozcelik D, Naumova E, Pawelec G. Multiparameter flow cytometric analysis of CD4 and CD8 T cell subsets in young and old people. *Immun Ageing A.* 25 juill 2008;5:6.

119. Atanackovic D, Panske J, Schafhausen P, Faltz C, Bartels K, Boeters I, et al. Peripheral T cells of patients with B cell non-Hodgkin's lymphoma show a shift in their memory status. *Leuk Res.* sept 2005;29(9):1019-27.

120. Zhang DKY, Adu-Berchie K, Iyer S, Liu Y, Cieri N, Brockman JM, et al. Enhancing CAR-T cell functionality in a patient-specific manner. *Nat Commun.* 31 janv 2023;14(1):506.

121. Hinrichs CS, Borman ZA, Gattinoni L, Yu Z, Burns WR, Huang J, et al. Human effector CD8+ T cells derived from naive rather than memory subsets possess superior traits for adoptive immunotherapy. *Blood.* 20 janv 2011;117(3):808-14.

122. Gattinoni L, Klebanoff CA, Palmer DC, Wrzesinski C, Kerstann K, Yu Z, et al. Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells. *J Clin Invest.* 1 juin 2005;115(6):1616-26.

123. Mehta PH, Fiorenza S, Koldej RM, Jaworowski A, Ritchie DS, Quinn KM. T Cell Fitness and Autologous CAR T Cell Therapy in Haematologic Malignancy. *Front Immunol.* 25 nov 2021;12:780442.

124. Zugmaier G, Gökbüget N, Klinger M, Viardot A, Stelljes M, Neumann S, et al. Long-term survival and T-cell kinetics in relapsed/refractory ALL patients who achieved MRD response after blinatumomab treatment. *Blood.* 10 déc 2015;126(24):2578-84.

125. Choufi B, Trauet J, Thiant S, Labalette M, Yakoub-Agha I. Donor-derived CD4(+)/CCR7(+) T-cell partial selective depletion does not alter acquired anti-infective immunity. *Bone Marrow Transplant.* mai 2014;49(5):611-5.

126. Yakoub-Agha I, Saule P, Depil S, Micol JB, Grutzmacher C, Boulanger-Villard F, et al. A high proportion of donor CD4⁺ T cells expressing the lymph node-homing chemokine receptor CCR7 increases incidence and severity of acute graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancy. :9.

127. Coghill JM, Carlson MJ, Panoskaltsis-Mortari A, West ML, Burgents JE, Blazar BR, et al. Separation of graft-versus-host disease from graft-versus-leukemia responses by targeting CC-chemokine receptor 7 on donor T cells. *Blood.* 10 juin 2010;115(23):4914-22.

128. 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.

129. Garfall AL, Dancy EK, Cohen AD, Hwang WT, Fraietta JA, Davis MM, et al. T-cell phenotypes associated with effective CAR T-cell therapy in postinduction vs relapsed multiple myeloma. *Blood Adv.* 1 oct 2019;3(19):2812-5.
130. Cuffel A, Allain V, Faivre L, Di Blasi R, Morin F, Vercellino L, et al. Real-world characteristics of T-cell apheresis and clinical response to tisagenlecleucel in B-cell lymphoma. *Blood Adv.* 21 juin 2022;bloodadvances.2022007057.
131. Barrett DM, Singh N, Liu X, Jiang S, June CH, Grupp SA, et al. Relation of clinical culture method to T cell memory status and efficacy in xenograft models of adoptive immunotherapy. *Cytotherapy.* mai 2014;16(5):619-30.
132. 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.* 21 mars 2019;129(6):2210-21.
133. Wada F, Jo T, Arai Y, Kitawaki T, Mizumoto C, Kanda J, et al. T-cell counts in peripheral blood at leukapheresis predict responses to subsequent CAR-T cell therapy. *Sci Rep.* 4 nov 2022;12:18696.
134. 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.
135. Singh N, Perazzelli J, Grupp SA, Barrett DM. Early memory phenotypes drive T cell proliferation in patients with pediatric malignancies. *Sci Transl Med.* 6 janv 2016;8(320):320ra3.
136. Arcangeli S, Bove C, Mezzanotte C, Camisa B, Falcone L, Manfredi F, et al. CAR T cell manufacturing from naive/stem memory T lymphocytes enhances antitumor responses while curtailing cytokine release syndrome [Internet]. American Society for Clinical Investigation; 2022 [cité 3 juill 2023]. Disponible sur: <https://www.jci.org/articles/view/150807/pdf>
137. Defossez G, Uhry Z, Delafosse P, Dantony E, d'Almeida T, Plouvier S, et al. Cancer incidence and mortality trends in France over 1990–2018 for solid tumors: the sex gap is narrowing. *BMC Cancer.* 24 juin 2021;21:726.
138. Lapôtre-Ledoux B, Benedicte LL, Dantony E, Grosclaude P, Molinié F, Woronoff AS, et al. // MAIN CANCERS INCIDENCE IN METROPOLITAN FRANCE IN 2023 AND TRENDS SINCE 1990.
139. Defossez G, Le Guyader-Peyrou Sandra. Synthèse - Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 Saint-Maurice : Santé publique France, 2019. 20 p. [Internet]. [cité 27 mars 2022]. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Synthese-Estimations-nationales-de-l-incidence-et-de-la-mortalite-par-cancer-en-France-metropolitaine-entre-1990-et-20182>
140. Salaverria I, Philipp C, Oschlies I, Kohler CW, Kreuz M, Szczepanowski M, et al. Translocations activating IRF4 identify a subtype of germinal center-derived B-cell lymphoma affecting predominantly children and young adults. *Blood.* 7 juill 2011;118(1):139-47.
141. Monnereau A, Cornet E, Maynadié M. Survie des personnes atteintes de cancer en France métropolitaine 1989-2018 – Lymphome diffus à grandes cellules B. Boulogne-Billancourt : Institut national du cancer, mars 2021, 12 p. 2021.
142. Liu Y, Barta SK. Diffuse large B-cell lymphoma: 2019 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol.* mai 2019;94(5):604-16.
143. Tilly H, Morschhauser F, Sehn LH, Friedberg JW, Trněný M, Sharman JP, et al. Polatuzumab Vedotin in Previously Untreated Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med.* 27 janv 2022;386(4):351-63.
144. Melchardt T, Egle A, Greil R. How I treat diffuse large B-cell lymphoma. *ESMO Open.* 10 janv 2023;8(1):100750.
145. Poeschel V, Held G, Ziepert M, Witzens-Harig M, Holte H, Thurner L, et al. Four versus six cycles of CHOP chemotherapy in combination with six applications of rituximab in patients with aggressive B-cell lymphoma with favourable prognosis (FLYER): a randomised, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Lond Engl.* 21 déc 2019;394(10216):2271-81.

146. Dunleavy K, Fanale MA, Abramson JS, Noy A, Caimi PF, Pittaluga S, et al. Dose-adjusted EPOCH-R (etoposide, prednisone, vincristine, cyclophosphamide, doxorubicin, and rituximab) in untreated aggressive diffuse large B-cell lymphoma with MYC rearrangement: a prospective, multicentre, single-arm phase 2 study. *Lancet Haematol.* déc 2018;5(12):e609-17.
147. Armitage JO, Corder MP, Leimert JT, Dick FR, Elliot TE. Advanced diffuse histiocytic lymphoma treated with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) without maintenance therapy. *Cancer Treat Rep.* 1980;64(4-5):649-54.
148. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E, et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 20 sept 2014;32(27):3059-68.
149. Sehn LH, Salles G. Diffuse Large B-Cell Lymphoma. Longo DL, éditeur. *N Engl J Med.* 4 mars 2021;384(9):842-58.
150. Friedberg JW. Relapsed/Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Hematology.* 10 déc 2011;2011(1):498-505.
151. Crump M, Neelapu SS, Farooq U, Van Den Neste E, Kuruvilla J, Westin J, et al. Outcomes in refractory diffuse large B-cell lymphoma: results from the international SCHOLAR-1 study. *Blood.* 19 oct 2017;130(16):1800-8.
152. Gisselbrecht C, Glass B, Mounier N, Singh Gill D, Linch DC, Trneny M, et al. Salvage Regimens With Autologous Transplantation for Relapsed Large B-Cell Lymphoma in the Rituximab Era. *J Clin Oncol.* 20 sept 2010;28(27):4184-90.
153. Hamlin PA, Zelenetz AD, Kewalramani T, Qin J, Satagopan JM, Verbel D, et al. Age-adjusted International Prognostic Index predicts autologous stem cell transplantation outcome for patients with relapsed or primary refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 15 sept 2003;102(6):1989-96.
154. Crump M, Kuruvilla J, Couban S, MacDonald DA, Kukreti V, Kouroukis CT, et al. Randomized comparison of gemcitabine, dexamethasone, and cisplatin versus dexamethasone, cytarabine, and cisplatin chemotherapy before autologous stem-cell transplantation for relapsed and refractory aggressive lymphomas: NCIC-CTG LY.12. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 nov 2014;32(31):3490-6.
155. Hamadani M, Hari PN, Zhang Y, Carreras J, Akpek G, Aljurf MD, et al. Early failure of frontline rituximab-containing chemo-immunotherapy in diffuse large B cell lymphoma does not predict futility of autologous hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* nov 2014;20(11):1729-36.
156. Van Den Neste E, Schmitz N, Mounier N, Gill D, Linch D, Trneny M, et al. Outcome of patients with relapsed diffuse large B-cell lymphoma who fail second-line salvage regimens in the International CORAL study. *Bone Marrow Transplant.* 1 janv 2016;51(1):51-7.
157. Kamdar M. Lisocabtagene Maraleucel (liso-cel), a CD19-Directed Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cell Therapy, Versus Standard of Care (SOC) with Salvage Chemotherapy (CT) Followed By Autologous Stem Cell Transplantation (ASCT) As Second-Line (2L) Treatment in Patients (Pts) with Relapsed or Refractory (R/R) Large B-Cell Lymphoma (LBCL): Results from the Randomized Phase 3 Transform Study. In ASH; 2021 [cité 2 avr 2022]. Disponible sur: <https://ash.confex.com/ash/2021/webprogram/Paper147913.html>
158. Westin J, Sehn LH. CAR T cells as a second-line therapy for large B-cell lymphoma: a paradigm shift? *Blood.* 5 mai 2022;139(18):2737-46.
159. Štach M, Pytlík R, Šmilauerová K, Rychlá J, Mucha M, Musil J, et al. Characterization of the input material quality for the production of tisagenlecleucel by multiparameter flow cytometry and its relation to the clinical outcome. *Pathol Oncol Res.* 20 avr 2023;29:1610914.
160. Kondo T, Imura Y, Chikuma S, Hibino S, Omata-Mise S, Ando M, et al. Generation and application of human induced-stem cell memory T cells for adoptive immunotherapy. *Cancer Sci.* 2018;109(7):2130-40.
161. Castella M, Caballero-Baños M, Ortiz-Maldonado V, González-Navarro EA, Suñé G, Antoñana-Vidósola A, et al. Point-Of-Care CAR T-Cell Production (ARI-0001) Using a Closed

- Semi-automatic Bioreactor: Experience From an Academic Phase I Clinical Trial. *Front Immunol.* 20 mars 2020;11:482.
162. Monfrini C, Stella F, Aragona V, Magni M, Ljevar S, Vella C, et al. Phenotypic Composition of Commercial Anti-CD19 CAR T Cells Affects In Vivo Expansion and Disease Response in Patients with Large B-cell Lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2 août 2022;28(15):3378-86.
163. Xu Y, Zhang M, Ramos CA, Durett A, Liu E, Dakhova O, et al. Closely related T-memory stem cells correlate with in vivo expansion of CAR-CD19-T cells and are preserved by IL-7 and IL-15. *Blood.* 12 juin 2014;123(24):3750-9.
164. Sauter CS, Senechal B, Rivière I, Ni A, Bernal Y, Wang X, et al. CD19 CAR T cells following autologous transplantation in poor-risk relapsed and refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood.* 15 août 2019;134(7):626-35.
165. Filosto S, Vardhanabhuti S, Canales M, Poiré X, Lekakis LJ, de Vos S, et al. Abstract CT004: Product attributes of axicabtagene ciloleucel (axi-cel) that associate differentially with efficacy and toxicity in second-line large B-cell lymphoma. *Cancer Res.* 15 juin 2022;82(12_Supplement):CT004.
166. Locke FL, Rossi JM, Neelapu SS, Jacobson CA, Miklos DB, Ghobadi A, et al. Tumor burden, inflammation, and product attributes determine outcomes of axicabtagene ciloleucel in large B-cell lymphoma. *Blood Adv.* 13 oct 2020;4(19):4898-911.
167. Rossi J, Paczkowski P, Shen YW, Morse K, Flynn B, Kaiser A, et al. Preinfusion polyfunctional anti-CD19 chimeric antigen receptor T cells are associated with clinical outcomes in NHL. *Blood.* 23 août 2018;132(8):804-14.
168. Fried S, Avigdor A, Bielgorai B, Meir A, Besser MJ, Schachter J, et al. Early and late hematologic toxicity following CD19 CAR-T cells. *Bone Marrow Transplant.* oct 2019;54(10):1643-50.
169. Cordeiro A, Bezerra ED, Hirayama AV, Hill JA, Wu QV, Voutsinas J, et al. Late Events after Treatment with CD19-Targeted Chimeric Antigen Receptor Modified T Cells. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* janv 2020;26(1):26-33.
170. Boulch M, Cazaux M, Cuffel A, Ruggiu M, Allain V, Corre B, et al. A major role for CD4+ T cells in driving cytokine release syndrome during CAR T cell therapy. *Cell Rep Med [Internet].* 17 août 2023 [cité 22 août 2023];0(0). Disponible sur: [https://www.cell.com/cell-reports-medicine/abstract/S2666-3791\(23\)00314-2](https://www.cell.com/cell-reports-medicine/abstract/S2666-3791(23)00314-2)
171. Bove C, Arcangeli S, Falcone L, Camisa B, Khoury RE, Greco B, et al. CD4 CAR-T cells targeting CD19 play a key role in exacerbating cytokine release syndrome, while maintaining long-term responses. *J Immunother Cancer.* 1 janv 2023;11(1):e005878.
172. Good Z, Spiegel JY, Sahaf B, Malipatlolla MB, Ehlinger ZJ, Kurra S, et al. Post-infusion CAR TReg cells identify patients resistant to CD19-CAR therapy. *Nat Med.* sept 2022;28(9):1860-71.
173. Dean EA, Mhaskar RS, Lu H, Mousa MS, Krivenko GS, Lazaryan A, et al. High metabolic tumor volume is associated with decreased efficacy of axicabtagene ciloleucel in large B-cell lymphoma. *Blood Adv.* 23 juill 2020;4(14):3268-76.
174. Vercellino L, Di Blasi R, Kanoun S, Tessoulin B, Rossi C, D'Aveni-Piney M, et al. Predictive factors of early progression after CAR T-cell therapy in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Adv.* 12 nov 2020;4(22):5607-15.
175. García-Calderón CB, Siervo-Martínez B, García-Guerrero E, Sanoja-Flores L, Muñoz-García R, Ruiz-Maldonado V, et al. Monitoring of kinetics and exhaustion markers of circulating CAR-T cells as early predictive factors in patients with B-cell malignancies. *Front Immunol.* 14 avr 2023;14:1152498.
176. Jalota A, Hershberger CE, Patel MS, Mian A, Faruqi A, Khademi G, et al. Host metabolome predicts the severity and onset of acute toxicities induced by CAR T-cell therapy. *Blood Adv.* 23 août 2023;7(17):4690-700.
177. 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.
178. Rial Saborido J, Völkl S, Aigner M, Mackensen A, Mougiakakos D. Role of CAR T Cell Metabolism for Therapeutic Efficacy. *Cancers*. 4 nov 2022;14(21):5442.
179. 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.
180. 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*. 15 avr 2019;129(5):2123-32.
181. Balagopal S, Sasaki K, Kaur P, Nikolaidi M, Ishihara J. Emerging approaches for preventing cytokine release syndrome in CAR-T cell therapy. *J Mater Chem B*. 28 sept 2022;10(37):7491-511.
182. Caimi PF, Pacheco Sanchez G, Sharma A, Otegbeye F, Ahmed N, Rojas P, et al. Prophylactic Tocilizumab Prior to Anti-CD19 CAR-T Cell Therapy for Non-Hodgkin Lymphoma. *Front Immunol*. 2021;12:745320.

ANNEXES

Tables des figures

Figure 1 : Structure des CAR-T cells (3).....	3
Figure 2 : Voie d'activation NfκB dans le Lymphocyte T selon Thaker et al. (8).....	5
Figure 3 : Polarisation de la réponse immunitaire T selon Leung et al.(10).....	5
Figure 4 : Mécanisme d'activation d'un Lymphocyte T (A) et d'un CAR-T cell (B) selon Rubio et al.(13).....	6
Figure 5 : Différentes générations de CAR-T cells selon Tomasik et al. (19).....	7
Figure 6 : Circuit des CAR-T cells au CHU de Lille adapté(37).....	9
Figure 7 : Délais d'arrêt des traitements avant leucaphérèse selon Qayed et al.(38).....	10
Figure 8 : Exemple d'immunophénotypage lymphocytaire sur produit de leucaphérèse au CHR de Lille.....	11
Figure 9 : Critères Qualités rapportés par Delgado et al.(55).....	13
Figure 10 : Algorithme de prise en charge du CRS (44).....	15
Figure 11 : Physiopathologie du CRS selon Zhang et al. (70).....	16
Figure 12 : Mécanisme de la Neurotoxicité selon Gu et al.(77).....	18
Figure 13 : Algorithme de prise en charge d'une Neurotoxicité liée aux CAR-T cells (83).....	19
Figure 14 : Principe de la Cytométrie en Flux (90).....	21
Figure 15 : Exemple de Gating selon Verschoor et al. (89).....	21
Figure 16 : Méthodes de marquage en Cytométrie en Flux des CAR-T cell selon Rubio et al.(93).....	23
Figure 17 : Épissage alternatif du gène CD45 selon Zikherman et al.(96).....	24
Figure 18 : Rôle du CD45 dans l'activation Lymphocytaire T selon Zikherman et al.(100).....	25
Figure 19 : Différenciation lymphocytaire adapté de Gattinoni et al.(104).....	27
Figure 20 : Exemple d'immunophénotypage lymphocytaire sur poche de CAR-T cells au CHU de Lille.....	28
Figure 21 : Répartitions des CAR-T cells et des hémopathies réinjectés par CAR-T cells au CHU à Lille.....	31
Figure 22 : Traitement de 2 ^{ème} ligne des DLBCL à l'ère des CAR-T cells selon Westin et al. (158).....	34
Article Figure 1 : Flowchart.....	46
Article Figure 2 : Leukapheresis T cell repartition in Cohort I.....	47
Article Figure 3 : Leukapheresis and CAR-T cell repartition in Cohort II.....	49
Article Figure 4 : Progression Free Survival curves in Cohort III.....	60

Table des tableaux

Tableau 1 : Principaux marqueurs antigéniques utilisés pour l'immunophénotypage des cellules hématologiques.....	20
Tableau 2 : Principaux sous types de LBCL selon la classification OMS 2022	32
Article Table 1 : Cohort III baseline characteristics.....	50
Article Table 2 : T cell and CAR-T cell repartition in Cohort III.	51
Article Table 3 : Tolerance and response assesment in Cohort III	53
Article Table 4 : Clinical outcomes and leukapheresis immature subset in Axi-cel Cohort.....	54
Article Table 5 : Transduction rate and Expansion outcomes.....	56
Article Table 6 : Expansion and Transduction outcomes in the Axi-cel Cohort	58

Serment d'Hippocrate

Je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je promets et je jure de conformer strictement ma conduite professionnelle aux principes traditionnels.

Admis dans l'intérieur des maisons mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'Humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pairs.

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

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes Confrères si j'y manque.

AUTEUR : Nom : CHANTEAU

Prénom : Guillaume

Date de soutenance : 9 octobre 2023

Titre de la thèse : Apport de l'immunophénotypage lymphocytaire dans l'utilisation des CAR-T cells, à propos d'une cohorte rétrospective monocentrique

Thèse - Médecine - Lille 2023

Cadre de classement : Médecine

DES + FST/option : Hématologie

Mots-clés : CAR-T cells, Immunophénotypage, CMF, CCR7, Naïf, CRS, Anémie

Résumé :

Contexte :

Les CAR-T cells ont révolutionné le pronostic de nombreux patients atteints d'hémopathies malignes en rechute ou réfractaires. Cependant, l'efficacité et la tolérance sont hétérogènes entre les patients. Ce traitement s'accompagne d'effets indésirables importants comme le Syndrome de Relargage de Cytokines (CRS) et la Neurotoxicité. Les CAR-T cells sont fabriqués à partir de lymphocytes T issus d'une leucaphérèse. Ces cellules peuvent être analysées par immunophénotypage lymphocytaire. L'objectif est d'évaluer l'intérêt de cet examen pour prédire la transduction, la réponse et la toxicité du traitement par CAR-T cells.

Méthode :

Nous avons suivi une cohorte rétrospective monocentrique de patients traités par CAR-T cells et ayant bénéficié d'un immunophénotypage lymphocytaire sur leucaphérèse et sur produit de CAR-T cells. Nous avons étudié les sous-populations de lymphocytes T et les avons classés en 4 sous populations : naïfs (TN), central mémoire (TCM), effecteur mémoire (TEM) et de différenciation terminale (TTD) à l'aide de 4 marqueurs (CD4, CD8, CD45RA et CCR7). Les comparaisons ont été réalisées par tests bilatéraux et seuil significatif à 5%. La survie globale et la survie sans progression ont été estimées par méthode de Kaplan-Meier.

Résultats :

81 patients ayant reçu différents CAR-T cells ont été inclus avec un taux de transduction médian de 65,4%, qui n'est pas de corrélé aux populations d'intérêts du produit de leucaphérèse. Dans un sous-groupe de 32 patients réinjectés par Axi-cel on retrouve une association entre une élévation des TN CD4 dans le produit de leucaphérèse et le risque de CRS de grade > 1 ($p=0,01$) et ces TN CD4 avec le taux de CAR-T à J7 ($p= 0,007$). On retrouve une association entre le taux de CAR-T à J7 et le risque de CRS de grade > 1 ($p=0,006$). Les lymphocytes CCR7 CD8 du produit de leucaphérèse sont associés au risque d'anémie de Grade > 2 ($p=0,03$). Aucune population de la leucaphérèse n'est associée à la réponse aux CAR-T cells.

Conclusion :

L'immunophénotypage lymphocytaire du produit de leucaphérèse n'est pas prédictif d'une meilleure transduction ou efficacité après CAR-T cells. L'étude du produit de leucaphérèse pourrait permettre de prédire le risque de CRS de grade > 1 et d'anémie de grade > 2.

Composition du Jury :

Président : Pr Thierry FACON

Assesseurs : Pr Ibrahim YAKOUB-AGHA, Pr Franck MORSCHHAUSER, Dr Julie DEMARET

Directeur de thèse : Dr Paul CHAUVET